

Embigiinin hiljennys häiritsee hiiren keratinosyyttien aineenvaihduntaa

Pro gradu -tutkielma

Turun yliopisto

Bioteknologian laitos

Biokemia

2021

Jeremi Turkia

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

TURKIA, JEREMI: Embigiinin hiljennys häiritsee hiiren keratinosyyttien aineenvaihduntaa

Pro gradu -tutkielma, 61 s.

Biokemia

4.2021

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkistettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

Embigiini (GP-70) on solujen pinnoilla esiintyvä, kalvon läpäisevä glykoproteiini. Se osallistuu solujen kiinnittymiseen soluväliaineeseen ja vaikuttaa solujen aineenvaihduntaan. Sillä on erityisen tärkeä rooli pienten ravintoaineiden kuljetuksessa sisään soluihin ja pois soluista. Näillä glykoproteiineilla ei kuitenkaan itsessään ole aktiivisuutta ravinteiden kuljettajina, vaan ne vaikuttavat epäsuorasti mahdollistaen monokarboksylaattien kantajaproteiini (engl. *monocarboxylate transporter*, MCT) toiminnan tarjoamalla näille sitoutumispaikan solukalvolla. MCT-proteiinit ovat protonilinkattuja plasmamembraanin kantajaproteiineja, jotka kuljettavat pieniä ravintoaineita solun sisään ja solusta ulos. Näihin ravintoaineisiin kuuluvat erityisesti pienet energiamolekyylit kuten tietyt sokerijohdannaiset ja energia-aineenvaihdunnan sivutuotteet, esim. laktaatti. MCT-perheen proteiinit vaativat joko embigiinin tai samankaltaisen glykoproteiinin, basigiinin, läsnäolon. MCT1 ja 4-proteiinit sitoutuvat pääsääntöisesti basigiiniin, ja MCT2-proteiinit embigiiniin.

Hiiren IMBCA-keratinosyyttien embigiini, basigiini ja MCT-perheen proteiinien ilmentyminen mitattiin kvantitatiivisellä PCR:llä, jossa havaittiin solujen ilmentävän sekä basigiinia että embigiiniä, sekä lukuisia MCT-proteiineja, mukaan lukien MCT1 ja MCT2-proteiineja. Tutkimuksessa tarkasteltiin embigiinin ilmenemisen häiritsemisen vaikutusta solujen metaboliaan. Kokeissa embigiini hiljennettiin erilaisilla siRNA:lla eri olosuhteissa. siRNA:n hiljentävä vaikutus todettiin virtaussytometrialla havaitsemalla vähentynyt embigiinin määrä solujen pinnalla. Solujen aineenvaihduntaa mitattiin Agilent Seahorse-laitteella, joka mittaa solujen hapenkulutusta ja mediumin happamoitumista, jotka ovat molemmat riippuvaisia solujen mitokondriaalisesta energiantuotosta ja glykolyysistä.

Embigiinin hiljennys vaikuttaa vähentävän mediumin happamoitumista. Kun solujen mitokondriaalinen aineenvaihdunta estetään spesifisillä inhibiittoreilla, hiljentämättömät solut aiheuttavat suuremman mediumin happamoitumisen viitaten parempaan aineenvaihduntatuotteiden poistoon. Hiljennetyt solut eivät nosta yhtä paljon happamuutta, vastaavasti viitaten alentuneeseen kykyyn poistaa happamia aineenvaihduntatuotteita. Solut hiljennettiin myös erilaisten soluväliaineiden läsnäollessa, mutta tulokset olivat hyvin vaihtelevia, eikä selvää yhteyttä havaittu. Basigiinin hiljennys vaikuttaa samalla tavalla aineenvaihduntaa häiritsevästi.

Avainsanat: embigiini, basigiini, MCT1, MCT2, aineenvaihdunta, laktaatti

Sisältö	1
Lyhenteet	3
1. Kirjallisuuskatsaus	5
1.1 Johdanto	5
1.2 Soluväliaine ja adheesiomolekyylit	6
1.2.1 Soluväliaine vaikuttaa soluihin soluadheesioproteiinien välityksellä	6
1.2.2 Soluadheesiomolekyylit ovat solujen linkki ympäristöönsä	8
1.3 Basigiiniperheen proteiinit	11
1.3.1 Basigiini vaikuttaa adheesioon, aineenvaihduntaan sekä viestintään	11
1.3.2 Embigiini on basigiinin tapainen glykoproteiini	13
1.3.2.1 Embigiiniä esiintyy harvemmin kuin basigiinia, mutta vaikuttaa moniin prosesseihin	15
1.3.2.2 Embigiinillä on monia rooleja kehityksestä syöpiin ja hermo -lihasliitoksiin	15
1.3.2.3 Embigiinin geeni on huomattavan pitkä ja monimutkainen	17
1.3.3 Neuroplastiini on kolmas basigiinisuperperheen proteiini	18
1.4 MCT-proteiiniperhe solujen aineenvaihdunnassa	19
1.4.1 MCT-proteiiniperhe siirtää ravinteita ja kuona-aineita solukalvon läpi	19
1.4.2 MCT1, 2 ja 4 esiintyvät limittäin ja täydentävät toisiaan	22
1.5 MCT- ja basigiini-perheen proteiinien vuorovaikutukset	25
1.5.1 MCT-proteiinit vaativat apuproteiinin toimiakseen	25
1.5.2 Hiilihappoanhydraasit tehostavat MCT-proteiinien toimintaa apuproteiinien välityksellä	26
1.5.3 MCT-proteiinien toimintaa voidaan estää inhiboimalla niiden apuproteiineja	27
2 Tutkimuksen tavoitteet	29
3 Materiaalit ja menetelmät	32
3.1 Tietokannat	33
3.2 Solulinjat ja kasvatus	33
3.3 Geenien ilmeneminen määritettiin qPCR:llä	34

3.4 Embigiinin hiljennys	35
3.5 Western blot	36
3.6 Virtaussytometria	36
3.7 Metaboliomittaukset	37
3.8 Tilastollinen analyysi	39
 4 Tulokset	 40
4.1 Tietokannat sisältävät rajoitetusti tietoa embigiinin ilmenemisestä	40
4.1.1 embigiiniä esiintyy monissa aikuisen ihmisen kudoksissa ja soluissa	40
4.1.2 Embigiini vaikuttaa moniin tauteihin	42
4.2 Keratinosyytit ilmensivät haluttuja proteiineja	43
4.3 Embigiinin toimiva pintahiljennys todettiin virtaussytometrialla	44
4.4 Solujen embigiinin määrää tarkasteltiin western blotilla	45
4.5 Embigiinin häiritseminen vaikutti mediumin happamoitumisnopeuteen	47
 5 Tulosten tarkastelu	 52
5.1 Embigiiniä esiintyy monissa kudoksissa kuten ihossa ja sen keratinosyyttisoluiissa	52
5.2 Western blot -tulokset ovat ristiriidassa muun datan kanssa	54
5.3 siRNA -hiljennys laski embigiinin määrää keratinosyyttisolujen pinnalla	55
5.4 Embigiinin ja basigiinin hiljennyksellä on mediumin happamoittamista laskeva vaikutus, luultavasti energia-aineenvaihdunnan häiritsemisen takia	55
5.5 Solumetabolian mittaaminen pH:n kautta on toimiva menetelmä koeasetelmalle	59
5.6 Tutkimusten jatkaminen	60
 6 Yhteenveto	 61
 Lähteet	 62

Lyhenteet

Lyhenne	Suomeksi	Englanniksi
MCT	monokarboksylaattien kantajaproteiini	monocarboxylate carrier protein
ECM	soluväliaine	extracellular matrix
EMB	embigiini	embigin
BSG	basigiini	basigin
EGF	epidermaalinen kasvutekijä	epidermal growth factor
TNF-A	tuumorinekroositekijä alfa	tumor necrosis factor alfa
kDA	kilodalton	kilodalton
MMP	matriksin metalloproteaasi	matrix metalloprotease
EMMPRIN	soluvälitilan metalloproteaasien aktivoija	extracellular matrix metalloprotease inducer
MAP	mitogeenien aktivoima proteiinikinaasi	mitogen-activated protein kinase
CyP-A	syklofiliini A	cyclophilin A
PI3	fosfoinositoli 3	phosphoinositol 3
VEGF	verisuonen endoteelin kasvutekijä	vascular endothelial growth factor
AKT	aktiini	actin
BTB	veri-kiveseste	blood-testis-barrier
HPSC	hematopoieettinen kantasolu	hematopoietic stem cell
NCAM	hermosolun soluadheesiomolekyyli	neural cell adhesion molecule
HOXC	homeoboksi C	homeobox C
EMT	epiteelimäisen solun muuttuminen mesenkymaaliseksi	epithelial to mesenchymal transition
NP	neuroplastiini	neuroplastin
GLAST	glutamaatti-aspartaatti- kantajaproteiini	glutamate aspartate carrier protein
GLT1	glutamaatin kantajaproteiini	glutamate carrier protein

GLUT	glukoosin kantajaproteiini	glucose transporter
HIF-1	hypoksian aktivoiva tekijä 1	hypoxia inducible factor 1
CA	hiilihappoanhydraasi	carbonic anhydrase
<i>p</i> CMBS	<i>p</i> -kloorimerkaptobentseeni-sulfonaatti	<i>p</i> -chloromercuribenzene sulfonate
cDNA	komplementaarinen DNA	complementary DNA
DMEM	Dulbecccon muokattu Eaglen mediumi	Dulbecco's modified Eagle's medium
qPCR	kvantitatiivinen PCR	quantative PCR
siRNA	pieni häiritsevä RNA	small interfering RNA
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos	phosphate buffered saline
FACS	fluoresenssin aktivoima solujen jaottelu	fluorescence-activated cell sorting
FCS	sikiöikäisen vasikan seerumi	fetal calf serum

1. Kirjallisuuskatsaus

1.1 Johdanto

Toimiva metabolia eli aineenvaihdunta on kaiken elämän perusta. Jotta mikään muu prosessi olisi mahdollinen, etenkin energia-aineenvaihdunnan on oltava toimiva. Yksilöt, kudokset ja yksittäiset solut vaativat jatkuvasti energiaa ylläpitääkseen homeostasiaansa ja erinäisiä biologisia prosessejaan. Oleellinen osa tässä ovat solukalvojen kantajaproteiinit, jotka kuljettavat hallitusti haluttuja energiapitoisia molekyylejä; yksi tällaisten kantajaproteiinien ryhmä on monokarboksylaattien kantajaproteiinit (engl. *monocarboxylate carrier protein*, MCT), jotka kuljettavat monille soluille tärkeitä, pieniä molekyylejä solukalvon läpi. (Halestrap ja Price 1999 (katsausartikkeli); Halestrap 2013 (katsausartikkeli)).

Monisoluisten eliöiden toiminnan kannalta on myös oleellista, että solut kykenevät kiinnittymään toisiinsa muodostaakseen toiminnallisia kokonaisuuksia. Ilman solujen kiinnittymistä ei monisoluisten eliöiden olemassaolo olisi mahdollista. Tähän vaaditaan kiinnittymis- tai adheesioproteiineja, kuten integriinejä, selektiinejä tai immunoglobuliini-superperheen proteiineja, johon embigiini kuuluu. (Chothia ja Jones 1997 (katsausartikkeli); Barczyk ja muut 2010). Nämä solu-solu sekä solu-soluväliaine - kiinnittymisen eli adheesion kannalta tärkeät proteiinit ovat usein läheisessä vuorovaikutuksessa tiettyjen kantajaproteiinien kanssa, etenkin MCT-perheen proteiinien kanssa. Tiedetyt adheesioproteiinit voivat tarjota kiinnittymis- ja lokalisoitumispaikan kantajaproteiinille. MCT-kantajaproteiiniperheellä sekä immunoglobuliini-superperheeseen kuuluvalla basigiini-proteiiniperheellä on tämänkaltaisen vuorovaikutus. Perheen proteiineilla, basigiinilla, embigiinillä ja neuroplastiinilla, on havaittu olevan monenlaisia rooleja eliöissä adheesion lisäksi; ne ovat myös MCT-proteiineille välttämättömiä. Ilman soveltuvaa basigiiniperheen proteiinia MCT-proteiinit eivät juurikaan ilmene solukalvon pinnalla. (Huang ja muut 1993; Halestrap ja Price 1999 (katsausartikkeli); Halestrap 2013 (katsausartikkeli)).

MCT-proteiinien toiminta on tärkeää solujen energianvaihdunnalle sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa. Muutokset niiden toiminnassa voivat sekä aiheuttaa

ongelmia normaaleille soluille että tehostaa syöpäsolujen aineenvaihduntaa. MCT-proteiinien lisäksi adheesioproteiinien on havaittu vaikuttavan syöpien syntyyn. Basigiiniperheen jäsenistä etenkin basigiinin ja embigiinin määrien muutokset voivat vaikuttaa syöpään. Koska näiden adheesioproteiinien on todettu suoraan vaikuttavan moniin syöpiin, aineenvaihdunnan ongelmiin sekä MCT proteiinien toimintaan, on mielekästä selvittää lisää, kuinka MCT-proteiinien toimintaan ja sitä kautta koko solun aineenvaihduntaan voidaan vaikuttaa basigiiniperheen proteiineja häiritsemällä. MCT-proteiineille on vähän suoria inhibiittoreita. Tämä ongelma voidaan kuitenkin kiertää muilla keinoilla, kuten niiden apuproteiinien toiminnan estämisellä tai ilmentymisen hiljentämisellä. (Huang ja muut 1993; Chothia ja Jones 1997 (katsausartikkeli); Halestrap ja Price 1999 (katsausartikkeli); Klier ja muut 2011; Chao ja muut 2015; Jung ja muut 2016).

1.2 Soluväliaine ja adheesiomolekyylit

Soluväliaine vaikuttaa kaikkien solujen toimintaan tarjoamalla soluille kiinnittymisalustan, sekä antamalla soluille niiden toiminnan kannalta tärkeitä viestejä. Solut tarttuvat soluväliaineeseen erilaisten soluadheesioproteiinien välityksellä. Myös tutkimukselle keskeiset basigiini ja embigiini ovat molemmat soluadheesioproteiineja, jotka vaikuttavat solujen kiinnittymiseen vuorovaikuttaen muiden adheesioproteiinien kuten integriinien kanssa. Vastaavasti niiden soluväliaineelta vastaanottamat viestit voivat vaikuttaa solujen toimintaan. (Huang ja muut 1993; Muramatsu 2016 (katsausartikkeli))

1.2.1 Soluväliaine vaikuttaa soluihin soluadheesioproteiinien välityksellä

Elävät solut ovat kaiken elämän perusta, ja vaikka solut kykenevät kiinnittymään toisiinsa ja muodostamaan rakennelmia kuten epiteelejä, monimutkaisempien eliöiden kudokset koostuvat myös solujen välisestä tilasta. Tämä soluväliaine (engl. *Extracellular matrix*, ECM) koostuu lukuisista solujen tuottamista ja erittämistä komponenteista, jotka muodostavat tukiverkon, joka usein muodostaa kudoksen fyysisen perustan ja tarjoaa soluille tarttumispaikan.

Soluväliaineella on monia tärkeitä biologisia rooleja. Se vaikuttaa kudoksien ja solujen erilaistumiseen, muodostumiseen sekä kudoksen homeostasiaan. Soluväliaine myös mahdollistaa ja ohjaa välttämätöntä solujen liikkumista sekä solujen selviämistä. (Jarvelainen ja muut 2009 (katsausartikkeli); Frantz ja muut 2010 (katsausartikkeli)). Soluväliaineen proteiinit ovat kollageeneja, elastiineja, fibronektiineja, laminiineja, proteoglykaaneja, tai glykoproteiineja. Nämä ryhmät voidaan lisäksi jakaa kahteen tyyppiin, usein säikeitä muodostaviin (kollageeni, elastiini, laminiini ja fibronektiini) sekä tyypillisesti säikeitä muodostamattomiin (proteoglykaanit ja glykoproteiinit), joista jälkimmäisiä kutsutaan myös säikeidenvälisiksi (engl. *interfibrillar*) molekyyleiksi. Koska proteoglykaanit ja glykoproteiinit ovat samankaltaisia, glykoproteiinit luetaan joissain lähteissä kuuluvaksi proteoglykaaneihin (Jarvelainen ja muut 2009 (katsausartikkeli); Frantz ja muut 2010 (katsausartikkeli)). Säikeitä muodostavat molekyylit kykenevät nimensä mukaisesti muodostamaan vankkoja säikeisiä rakenteita. Säikeidenväliset molekyylit puolestaan täyttävät suuren osan solujenulkoisesta tilasta. Sokeriosien vedensidontakyvyn ansiosta ne kykenevät muodostamaan geelimäisiä rakenteita, joilla on hyvä kyky vastustaa voimaa ja näin suojella kudosta. (Jarvelainen ja muut 2009 (katsausartikkeli); Frantz ja muut 2010 (katsausartikkeli))

Kollageenit ovat yleisimpiä soluväliaineen proteiineja, jotka voivat muodostaa jopa 30 % eläimen koko proteomin painosta. Ne muodostavat soluväliaineen rakenteellisen perustan, johon muut molekyylit liittyvät. Tukikudoksessa esiintyvät fibroblastit tuottavat ja erittävät suurimman osan kollageenista, jonka ne muokkaavat tarvittaviksi rakenteiksi, kuten tasaisiksi levyrakenteiksi tai pitkiksi kaapelimaisiksi säikeiksi. (Jarvelainen ja muut 2009 (katsausartikkeli); Frantz ja muut 2010 (katsausartikkeli))

Elastiinit, jotka tyypillisesti tarttuvat kollageenisäikeisiin, lisäävät kudoksen kykyä sietää ja vastustaa venytyksen ja fyysisen stressin aiheuttamia voimia. Ne mahdollistavat kudoksessa väliaikaisen muutoksen/venytyksen ja siitä normaalitilaan palautumisen. Niiden vahva assosiaatio kollageeniin on usein niiden venymistä rajoittava tekijä. (Jarvelainen ja muut 2009 (katsausartikkeli); Frantz ja muut 2010 (katsausartikkeli))

Fibronektiinit ovat proteiineja, joilla on suuri vaikutus solujen ja soluväliaineen toimintaan. Ne ovat tärkeä linkki solujen ja soluväliaineen välillä, sisältäen kiinnittymiskohtia sekä kollageenille että soluille. Ne vuorovaikuttavat etenkin solujen integriinien kanssa. Fibronektiinillä on erilaisia olomuotoja, avoimesta ja venyneemmästä muodosta sen sulkeutuneempaan muotoon. Fibronektiinillä on kyky reagoida mekaaniseen stressiin ja näin sillä on kyky vaikuttaa sekä omaan kollageenin sitokykyynsä että solujen integriinien kykyyn sitoutua siihen. Fibronektiinillä on näin vahva rooli solujen toiminnan säätelijänä. (Jarvelainen ja muut 2009 (katsausartikkeli); Frantz ja muut 2010 (katsausartikkeli))

Proteoglykaaneja tunnetaan suuri joukko. Katsausartikkelissaan Iozzo ja muut (2015) luokittelevat ne neljään karkeaan luokkaan esiintymispaikkojensa mukaan solunsisäisiksi (engl. *intracellular*), solun pinnalla esiintyviksi (engl. *cell surface*), solukalvon läheisyydessä esiintyvä (engl. *pericellular*) tai solunulkoinen (engl. *extracellular*). Näistä jälkimmäisin on ylivoimaisesti suurin ryhmä.

Koska soluväliaine on tärkeä kudoksen ja solujen toiminnalle, sen häiriöt johtavat usein koko kudoksen ja elinkokonaisuuden häiriöihin, ja erilaisten tautitilojen syntyyn. Soluväliaineen ongelmat voivat itsessään aiheuttaa taudin tai jokin muu häiriö voi aiheuttaa muutoksia soluväliaineeseen. Lähes kaikki soluväliaineen häiriöt aiheuttavat jonkinlaisia ongelmia ja vastaavasti hyvin monet taudit aiheuttavat muutoksia soluväliaineeseen. (Jarvelainen ja muut 2009 (katsausartikkeli); Frantz ja muut 2010 (katsausartikkeli))

1.2.2 Soluadheesiomolekyylit ovat solujen linkki ympäristöönsä

Solu-solu ja solu-väliaine -vuorovaikutukset ovat kaikille monisoluisille eliöille elintärkeitä. Nämä vuorovaikutukset ohjaavat koko yksilön rakennetta ja fysiologiaa ja ovat myös paikallisesti oleellisia solujen ja kudosten toimivuudelle. Solujen kasvu, polarisuus, erikoistuminen ja selviytyminen ovat kaikki prosesseja, joihin vuorovaikutukset solujen välillä sekä soluväliaineen kanssa vaikuttavat. Erilaiset solujen pintaproteiinit, soluadheesiomolekyylit, mahdollistavat erilaiset solujen

vuorovaikutukset Soluadheesiomolekyylit voidaan jakaa eri luokkiin, josta yleisimmät ovat integriinit, selektiinit, kadheriinit sekä immunoglobuliinisuperperheen proteiinit. (Albelda ja Buck 1990 (katsausartikkeli)).

Integriinit ovat aikaisin kehittynyt adheesioproteiiniryhmä, jotka osallistuvat moneen tärkeään prosessiin kuten yksilökehitykseen, patologiisiin prosesseihin ja solujen kiinnittymiseen soluväliaineeseen tai muihin soluihin. Ne kykenevät myös välittämään viestejä soluista ulos tai solujen sisään, joilla on usein vaikutusta solun käyttäytymiseen ja erikoistumiseen. Integriinit ovat heterodimeerejä, joita esiintyy 24 eri yhdistelmänä. (Albelda ja Buck 1990 (katsausartikkeli); Barczyk ja muut 2010 (katsausartikkeli)).

Toiminnallinen integriini koostuu α ja β -alayksikköparista, jotka eivät liity toisiinsa kovalenttisesti. Integriinit läpäisevät solukalvon, ja voivat esiintyä suorahkossa tai taipuneessa muodossa. Taipuneessa konformaatiossaan integriinin kyky tarttua solunulkoisiin ligandeihin, kuten soluväliaineeseen, on estynyt. Suorassa muodossaan se tarttuu ligandehinsa paremmin. Solunsisäiset prosessit voivat aktivoida konformaatiomuutoksia integriinissä, muuntaen sen ligandinsitomiskykyä ja näin solun käyttäytymistä; usein muut solun saamat signaalit vaikuttavat tähän prosessiin. Integriini voi olla osittain taittunut ja solun muu tilanne kuten sen jännittyneisyys voi vaikuttaa integriinin kykyyn tarttua ligandiinsa. Lisäksi Integriinidimeerit voivat kerääntyä ryhmiksi etenkin multivalenttien ligandien yhteydessä, jolloin niiden välittämät viestit vahvistuvat. (Barczyk ja muut 2010 (katsausartikkeli)).

Integriineillä on vahva ja tärkeä rooli solujen tarttumiseen, esiintyen solujen pinnoilla, jossa ne kykenevät tarttumaan solun solutukirankaan. Useimmiten integriinit liittyvät solun aktiinisäikeisiin ja harvemmin välikokoisiin säikeisiin, yhdistäen solun oman tukiverkoston solunulkoiseen matriksiin. (Barczyk ja muut 2010 (katsausartikkeli)). Integriineillä on myös osoitettu olevan tärkeitä vuorovaikutuksia basigiiniperheen proteiinien, kuten basigiinin ja embigiinin kanssa. Basigiinin vuorovaikutus integriinin kanssa mahdollistaa tärkeiden viestien välityksen sekä solujen kiinnittymisen (Muramatsu 2016 (katsausartikkeli)). Myös embigiinin on osoitettu vuorovaikuttavan

integriinin kanssa. Embigiinillä on osoitettu olevan tärkeä rooli solujen integriinivälitteisessä kiinnittymisessä (Huang ja muut 1993).

Selektiinit ovat solukalvon kerran läpäiseviä proteiineja. Ne koostuvat useasta peräkkäisestä domeenista. Selektiinit ovat tärkeitä immunologiassa, esiintyen runsaina lymfosyyttien pinnoilla, joissa ne (etenkin L-selektiini) esiintyvät etenkin solujen ulkonemissa, mikrovilluksissa, usein klustereissa. Selektiinit saavat aikaan lymfosyyttien hidastumisen ja ”rolling”-ilmiön. Vaikka selektiinien affiniteetti on melko heikko verrattuna muihin adheesioproteiineihin kuten integriinin vahvaan kiinnittymiseen, sen hyvin nopea tarttuminen ligandiinsa kykenee aikaansaamaan halutun reaktion leukosyyteissä vuorovaikutuksen heikkoudesta huolimatta. (Bevilacqua ja Nelson 1993 (katsausartikkeli); Kansas 1996 (katsausartikkeli)) Muiden adheesiomolekyylien tavoin selektiinit voivat myös välittää viestejä, pääasiassa solun ulkopuolelta sisäänpäin. Selektiinin signaloinnin on havaittu aktivoivan happiradikaalien tuottoa, jonka lisäksi selektiinien aktivaatio voi lisätä tuumorinekroositekijä-alfan (tuumorinekroositekijä engl. *tumor necrosis factor alfa*, TNF-A) ja interleukiini 8 -transkriptiota. (Kansas 1996 (katsausartikkeli)). Selektiinit voivat vaikuttaa erilaisiin tauteihin niiden tulehdusreaktiota aktivoivan vaikutuksen kautta. Niiden puute tai virheellinen toiminta voi tehdä tulehdusreaktioista liian heikkoja, tai liian vahvoja ja hallitsemattomia. (Bevilacqua ja Nelson 1993 (katsausartikkeli)).

Kadheriinit ovat joukko adheesiomolekyyliä, jotka vaikuttavat alkioden morfogeneesiin sekä luovat vakaita sidoksia kiinteissä kudoksissa ja epiteeleissä. Kadheriinit muodostavat homodimeerejä, jotka kiinnittyvät toisiin homodimeereihin. (Chothia ja Jones 1997 (katsausartikkeli); Beesley ja muut 2014)

Kadheriineja esiintyy lähes kaikissa monisoluisissa organismeissa. Ne kiinnittyvät toisiinsa uloimman 1-domeenin välityksellä, joka määrää kadheriinin spesifisyyden. Kadheriinit voivat sitoutua kahteen vastinsolun kadheriiniin. Tämä mahdollistaa vetoketjumaisen kadheriininketjun muodostumisen kahden solun välille. Muiden solujen kadheriinien lisäksi kadheriini voi kiinnittyä tiettyihin integriinityyppeihin, etenkin joidenkin T-solujen pinnoilla. (Chothia ja Jones 1997 (katsausartikkeli); Beesley ja muut 2014)

Yksi suuri solujen pintaproteiiniryhmä on immunoglobuliini-superperhe. Tähän perheeseen luokitellaan proteiinit, jotka muodostuvat nimensä mukaisesti pallomaisista itsenäisesti laskostuvista immunoglobuliinidomeeneista. Näitä domeeneja on usein yhdessä proteiinissa lukuisia. Immunoglobuliinit ovat proteiinisekvensseiltään hyvin vaihtelevia, ja niiden sekvenssien identtisyys on hyvin pientä, usein vain 10-30 %. Niiden luokittelu perustuukin niiden rakenteeseen, ja tiettyihin tärkeisiin aminohappoihin, etenkin immunoglobuliinirakenteen pintarakenteissa. Immunoglobuliinidomeeneilla on yleisesti samankaltaiset konformaatiot. Näiden konformaatioiden välillä on kuitenkin rakenteellisia eroja, joiden perusteella immunoglobuliinidomeenit voidaan jakaa eri luokkiin: V ("vaihteleva", engl. *variable*), C1, C2 ("pysyvä", engl. *constant* ja I ("Väli" engl. *intermediate*). Nämä voidaan merkitä myös pidemmin IgV, IgC1, IgC2 ja IgI. (Chothia ja Jones 1997 (katsausartikkeli)). Basigiini, embigiini ja neuroplastiini kuuluvat immunoglobuliiniryhmään, jossa ne muodostavat oman basigiini-proteiiniperheen (ks. alla).

1.3 Basigiiniperheen proteiinit

1.3.1 Basigiini vaikuttaa adheesioon, aineenvaihduntaan sekä viestintään

Basigiini tai CD147, on immunoglobuliiniperheeseen kuuluva solun pintaproteiini (kuva 1). Sillä on sen ilmenemismuodon mukaan kaksi (basigiini-2 tai vain basigiini), kolme (basigiini-1) tai harvemmissa tapauksissa vain yksi (basigiini 3 ja 4) immunoglobuliinidomeenia (Muramatsu 2016 (katsausartikkeli)). Immunoglobuliinidomeenien välissä on viiden aminohapon peptidi. Proteiini lävistää solukalvon kerran. Solun sisäpuolella on vain lyhyt C-terminaalinen häntä. Basigiini on glykolysaatioasteestaan riippuen 43-66 kDA kokoinen; glykolysoimaton proteiiniosa on noin 27 kDA. Kolmen domeenin pituinen ihmisen basigiini on 269 aminohappotähteen pituinen, hiiren 273 ja lyhyempi kahden domeenin muoto on 176 aminohappotähdettä pitkä (Miyauchi ja muut 1991). Glykosylaation on osoitettu olevan hyvin tärkeää basigiinin toiminnan kannalta. Glykosylaation puutteellisuus aiheuttaa glykoproteiinin biologisen aktiivisuuden heikentymisen (Li ja Nowak 2020). Basigiinista on havaittu myös irrallisia, liukenevia muotoja. Basigiini voidaan irrottaa solukalvosta proteolyysin

seurauksena, kun proteiini leikataan entsyymaattisesti sen tyvestä. Vaihtoehtoisesti kokonainen proteiini voi kulkeutua ulos solusta mikrovesikkelissä. Basigiini-2 on sen esiintymismuodoista selkeästi yleisin. Basigiini-3 ja -4 ovat huomattavasti harvinaisempia; basigiini-3 esiintyy basigiini-2:n endogeenisenä inhibiittorina. Basigiini-4:n on havaittu esiintyvän joissain syöpäsoluissa. (Liao ja muut 2011).

Basigiinin on osoitettu vaikuttavan vahvasti matriksin metalloproteaasien (MMP) toimintaan ja näiden kautta kudoksien muokkaukseen (Muramatsu 2016 (katsausartikkeli)). Se vaikuttaa myös vahvasti angiogeneesiin ja aineenvaihduntaan ollen olennainen myös monissa fysiologisissa toiminnoissa ja vaikuttaen erityisesti yksilönkehitykseen ja lisääntymiseen (Kirk ja muut 2000; Li ja Nowak 2020). Täydellinen basigiinin deletio on usein letaali ja elinkykyisetkin yksilöt ovat tyypillisesti steriilejä. Se on tärkeä myös näön ja muun hermoston kannalta. Basigiinilla voi myös vaikuttaa syövän leviämiseen ja kehitykseen. Jotkin taudinaiheuttajat, kuten malarialoisiot ja tuhkarokkovirus, käyttävät basigiinia reseptorinaan. Lisäksi sen läsnäolo avustaa epäsuoremmalla mekanismilla joidenkin tautien, kuten HI-viruksen leviämistä. Basigiini vaikuttaa myös ei-infektiivisiin sairauksiin, kuten niveltulehduksiin, sydän- ja verisuonitautiin sekä munuaisten fibroosiin eli arpeutumiseen. Basigiinilla on osoitettu olevan immuunijärjestelmää sääteleviä ominaisuuksia, kuten tietynlaisten lymfosyyttien inaktivointi. (Muramatsu 2016 (katsausartikkeli); Li ja Nowak 2020). Basigiini on reseptori monille molekyyleille, ja olennainen kaperoniproteiini MCT -perheen proteiineille. (Wilson ja muut 2005; Mannowetz ja muut 2012).

Basigiinin solunulkoiset immunoglobuliinidomeenit vaikuttavat MMP-proteiinien toimintaan. Sen on havaittu säätelevän MMP-1, -2, -3 ja -9 sekä MT1-MMP ja MT2-MMP -proteaaseja. Tästä juontuu sen harvinaisempi nimi EMMPRIN (engl. *extracellular matrix metalloprotease inducer*, soluvälitilan metalloproteaasien aktivoija). Tutkimukset ovat osoittaneet basigiinin vaikuttavan MAP-kinaasikaskadin kautta aktivoitakseen ERK-signaloinnin, joka puolestaan aktivoi joissain soluissa MMP-1, -2 ja -3 -proteaasien tuoton (Belton ja muut 2008). Basigiini toimii reseptorina syklofiliini A:lle (engl. *Cyclophilin A*, CyP-A), joka on proteiinien laskostumiseen liittyvä pääasiassa solujen sisällä esiintyvä proteiini, joka voi esiintyä myös liukoisessa muodossa solujen

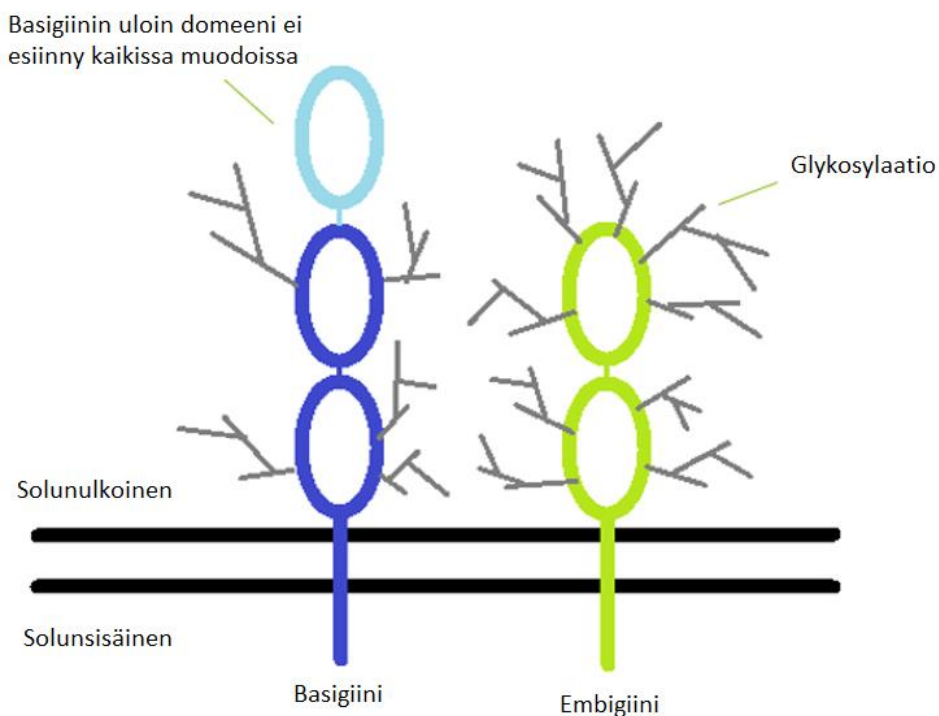
ulkopuolella. CyP-A:n sitoutuminen johtaa ERK-aktivaatioon ja MMP-tuotantoon (Yurchenko ja muut 2002). Basigiinin uskotaan myös aktivoivan mitogeenien aktivoimaa proteiinikinaasia (engl. *mitogen-activated protein kinase, MAPK*), joiden kinaasikaskadi aiheuttaa MT2-MMP ja MT1-MMP-proteaasien tuoton. Basigiinin on todettu myös vaikuttavan fosfoinositoli 3 kinaasikaskadiin (engl. *phosphoinositol 3 kinase, PI3K*). Tämä johtaa PI3K/akt-riippuvaiseen verisuoni-endoteelinen kasvutekijä (engl. *vascular endothelial growth factor, VEGF*) -tuottoon, joka puolestaan lisää uusien verisuonien syntyä. (Li ja Nowak 2020; Guindolet ja Gabison 2020 (katsausartikkeli)).

Basigiinin on havaittu aktivoivan soluväliaineen hajotusta lisäämällä MMP-proteiinien tuottoa ja indusoimalla myofibroblastien erilaistumista, jotka hajottavat ja uudelleenmuokkaavat soluväliainetta. Basigiinivälitteisellä solu-soluvuorovaikutuksella saattaa olla tässä tärkeä rooli. (Guindolet ja Gabison 2020 (katsausartikkeli)). Basigiinilla on tärkeitä rooleja lisääntymisessä. Se vaikuttaa sekä uros- että naarasyksilön sukusoluihin. Uroksilla spermatogeneesi vaatii lisääntymissolun ja niitä tukevan sertoli-solukon häiriötöntä vuorovaikutusta. Sertoli-solut muodostavat veri-kivesesteen, joka suojaa kehittyviä soluja muun muassa elimistön omalta immuunijärjestelmältä. Basigiinin on havaittu esiintyvän sertoli-solujen pinnalla, jossa sen puute johtaa spermatogeneesin estymiseen. Basigiini-poistogeenisten hiirien veri-kives-esteen on havaittu olevan vajavainen. (Mannowetz ja muut 2012) Lisäksi basigiini on tärkeä lisääntymissolujen ja sertoli-solujen vuorovaikutuksille, jossa sen puute häiritsee spermatogeneesin edistymistä. basigiinin puute vaikuttaa myös naarasyksilöihin, estäen munasolun kiinnittymistä aiheuttamatta kuitenkaan rakenteellisia muutoksia. Syy basigiinipuutoksen aiheuttamaan lisääntymisen estymiseen on naarailla huonommin tunnettu. (Li ja Nowak 2020).

1.3.2 Embigiini on basigiinin tapainen glykoproteiini

Embigiini on toinen basigiiniperheen ja immunoglobuliini-superperheen proteiini. Basigiinista poiketen se esiintyy pääasiassa kahden immunoglobuliinin pituisena (kuva 1). Nämä immunoglobuliinidomeenit ovat V-luokkaa. (Guenette ja muut 1997). Kuten basigiinilla, embigiinillä on myös yksi solukalvon läpäisevä osa ja lyhyt C-terminuksen

kalvonsisäinen osa. Embigiinin solunulkoinen osa on vahvasti glykosyloitu. Jopa yli puolet sen molekyylimassasta voi johtua glykosylaatiosta. Embryonaalisen karsinooman solujen pinnalla esiintyvän embigiinin on mitattu olevan ilman glykosylaatiota noin 30 Kda, massan ollessa 60–90 Kda glykosyloituna. (Huang ja muut 1993; Forero-Quintero ja muut 2019). Embigiinin immunoglobuliinidomeeneissa on yhdeksän N-linkatun glykosylaation mahdollistavaa kohtaa. Lisäksi immunoglobuliinidomeenien muodostavien proteiiniketjujen alku- ja loppupään aminohappotähteiden uskotaan muodostavan disulfidisillan, jotka vahvistavat domeenin rakennetta. (Guenette ja muut 1997). Guenette ja muut tutkivat analyysissään rotan embigiiniä. Kyseinen proteiini oli 329 aminohappotähdettä pitkä, jonka alkupään 23 ensimmäistä aminohappotähdettä muodostavat signaalijakson. Yksi membraanin läpäisevä alue (tähteet 254–282). Kaksi immunoglobuliinidomeenia muodostuivat tähteistä 88–145 ja 181–239. Tähteet 88, 145, 181 ja 239 sisälsivät disulfidisillat muodostavat tähteet. Koko proteiinin molekyylipainoksi arvioitiin 37 Kda.



Kuva 1. Embigiinin ja basigiinin karkea rakenne. Molemmat läpäisevät solukalvon kerran, proteiinien suurimpien rakenteiden ollessa solun ulkopuolella. Embigiini koostuu basigiinin tapaan glykosyloiduista immunoglobuliinidomeeneista, joita sillä on kaksi kappaletta toisin kuin basigiinilla, joka esiintyy sekä kahden että kolmen domeenin muodoissa, sekä harvemmin vain yhden domeenin muodossa.

1.3.2.1 Embigiiniä esiintyy harvemmin kuin basigiinia, mutta vaikuttaa moniin prosesseihin

Embigiinin on osoitettu esiintyvän aivoissa, rintakudoksessa, istukassa, maksassa sekä luu- ja hermokudoksissa (Jung ja muut 2016). Lisäksi omassa tutkimusryhmässämme aikaisemmin tehty hiiren kudosten vertailu on osoittanut embigiinin olevan läsnä useissa elimissä. Proteiinien Western blot näytti sen selkeän ilmenemisen etenkin kiveksissä, lisäkiveksissä, ihossa, keuhkoissa sekä munuaisissa. RNA-tasolla embigiini ilmeni useammassa elimessä. Esiintyminen kiveksissä korostaa embigiinin tärkeyttä erilaisissa kehitysprosesseissa. Lisäksi hiiret, joiden embigiinin ilmeneminen oli estetty menehtyvät usein sikiövaiheessa tai heti syntymän jälkeen. Näistä aikuisikään selviävät hiiret ovat kuitenkin yleisesti terveitä. Embigiinin vahvaho esiintyminen etenkin hiiren embryogeneesissä on tunnettu jo melko pitkään (Tachikui ja muut 1999).

Koska embigiini esiintyy tyypillisesti monissa edellä mainituissa kehitysprosesseissa sekä lisääntymisjärjestelmissä, jossa kantasolut ovat tärkeässä roolissa, ei ole yllättävää, että sen on havaittu esiintyvän monien kantasolujen yhteydessä muuallakin kuin vain yksilönkehityksen ja lisääntymisen yhteydessä. Embigiinin onkin havaittu esiintyvän hematopoieesissa eli verenmuodostuksessa, verisoluja muodostavissa kantasoluissa eli multipotenteissa hematopoieettisissa kantasoluissa. (engl. *Multipotent hematopoietic stem cell*). (Pridans ja muut 2008; Silberstein ja muut 2016).

Embigiinin esiintyy myös monissa syövässä, joissa sen normaali määrä voi vaihdella molempiin suuntiin. (Guenette ja muut 1997; Chao ja muut 2015). Embigiinin vaikutuksia ja rooleja syövässä ja muissa yhteyksissä käsitellään alla.

1.3.2.2 Embigiinillä on monia rooleja kehityksestä syöpiin ja hermo-lihasliitoksiin

Embigiinillä on näytetty olevan lukuisia biologisia tehtäviä. Se vaikuttaa integriinivälitteiseen soluadheesioon sekä vahvistaa hermo-lihas-adheesiota ja vaikuttaa myös hermo-lihasliitosten kehittymiseen. Lisäksi sillä on osoitettu olevan

tärkeä rooli aikaisessa yksilönkehityksessä, jossa sen on havaittu ilmenevän suurissa määrin hiiren embryogeneesissä. (Pridans ja muut 2008; Forero-Quintero ja muut 2019). Embigiinin on myös havaittu vaikuttavan solujen jakautumiseen, etenkin tiettyjen kantasolujen osalta. Kokeissaan Silberstein ja muut havaitsivat Embigiinin yhdeksi hematopoieettisten kantasolujen yhdeksi jakautumista estäväksi tekijäksi. Embigiini adheesioproteiinina näytti myös vaikuttavan vahvasti solujen sijoittumiseen ja pysymiseen niille ominaisessa lokerossaan. (Silberstein ja muut 2016). Embigiinillä vaikuttaa siis olevan olennainen rooli tämän kantasolupopulaation ylläpitäjänä ja säätelijänä.

Yksilönkehityksen ja kantasolujen ylläpidon lisäksi embigiinillä on havaittu olevan tärkeä rooli hermo-lihasliitoksen kehittymiseen. Tutkimuksissaan Lain ja muut (2009) havaitsivat embigiinin vahvan esiintymisen kehittyvässä lihassolussa, jossa sen määrä aikuisyksilön kehittyneessä lihaksessa vähenee. Embigiinin määrä kuitenkin nousi kokeiden mukaan vahvasti denervaation, eli lihashermojen menetyksen yhteydessä. Tällöin sillä olisi oleellinen rooli sekä hermo-lihasliitosten kehityksessä sekä uusissa soluissa että lihassoluissa, joiden hermosolut ovat jostain syystä surkastuneet. Tarkkaa mekanismia ei selvitetty, mutta selvää oli embigiinin tärkeä neuro-lihaskehityksen rooli ja embigiinin toiminnallinen samankaltaisuus ja synergia NCAM-molekyylin kanssa (hermosolun adheesiomolekyyli, engl. *Neural cell adhesion molecule*), joka on vastaavasti tärkeä hermosolujen kehitykselle, etenkin aikaansaaden neuriittien eli hermosolujen ulkonemien, synnyn.

Samoin kuin basigiinin on havaittu esiintyvän runsaasti tiettyjen syöpien yhteydessä, embigiininkin määrien muutokset ovat mahdollisia syöpään vaikuttavia tekijöitä. Embigiinin määrän vaikutus syöpiin ei kuitenkaan ole yksiselitteinen. Embigiinin on havaittu tietyissä tapauksissa lisäävään ja toisissa vähentävän syövän patogeenisia ominaisuuksia kuten migraatiota. Jung ja muut (2016) havaitsivat kokeissaan Korkean embigiinin määrän lisäävän haiman adenokarsinooman aggressiivisuutta. Tässä yhteydessä embigiinin hiljennys vähensi solujen liikkumista ja invaasiota ja inhiboi kasvaimen kasvua in vivo. (Jung ja muut 2016). Embigiinin läsnäolo lisäsi solujen epiteelimaisten solujen muuttumista mesenkymaalisiksi, lisäten solujen liikkuvuutta.

Toisaalta embigiinin on osoitettu olevan rintasyövän tuumorigeneesiä estävä tekijä (Chao ja muut 2015). Embigiinillä on siis monia fysiologisia rooleja ja vasteita, eikä sen korkea tai matala määrä ole yksiselitteisesti hyvän tai huonon prognoosin tekijä. Embigiinin määrän vaikutus on lähes täysin kontekstista riippuvaista. Embigiinin korkea määrä voi siis tilanteesta ja syöpä- tai kudostyyppistä riippuen olla sekä negatiivinen tai positiivinen prognostinen merkki.

Myös syövissä embigiini vaikuttaa osana kokonaisuutta. Tietyissä syövissä S100A4-proteiinien (S100 kalsiumia sitova proteiini A4) on havaittu toimivan embigiinin ligandina. S100A4 on solunulkoinen proteiini, joka liitetään usein syövän leviämiseen: sen läsnäolo lisää syöpäsolujen liikkuvuutta, sekä aktivoi endoteelisoluja lisäten angiogeneesiä. Tietyissä yhteyksissä embigiinin vuorovaikutus S100A4:n kanssa lisää solujen migraatiokykyä. (Ruma ja muut 2018).

1.3.2.3 Embigiinin geeni on huomattavan pitkä ja monimutkainen

Hiiren genomilla tehtyjen kokeiden mukaan hiiren embigiinin geeni on reilut 50 kb pitkä, sisältäen 9 eksonia. Molempia immunoglobuliinidomeeneja koodaa kaksi eksonia. Tutkijat painottivat tässä yhteydessä embigiinin geenin olevan basigiinin geeniä huomattavasti pidempi, basigiinin geenin ollessa vain 7 kb. Suurin osa tästä pituuserosta selittyy embigiinin huomattavasti pidemmistä intronisekvensseistä. Embigiini sisältää myös lukumääräisesti enemmän eksoneja kuin basigiini, jonka N-terminuksen alue sisältyy yhteen eksoniin, embigiinin vaatiessa kaksi. Lisäksi basigiinin C-terminusta koodaa kaksi eksonia, luvun ollessa embigiinin geenissä kolme. Tutkijat myös huomasivat embigiinin erikoisen promoottorirakenteen, josta puuttui TATA ja CAAT -konsensusalueet. Embigiinin promoottori vaikutti rakenteeltaan enemmän perusaineenvaihduntatuotetta koodaavalta geeniltä (engl. *housekeeping gene*), eli helposti aktiivisena pysyvältä geeniltä, joka oli näennäinen paradoksi sen vaihtelevan ilmenemisen kanssa. Tutkijat uskoivat erillisen negatiivisen kontrollielementin estävän embigiinigeenin tarpeettoman ilmenemisen. (Tachikui ja muut 1999).

Kokeissaan Chao ja muut (2015) havaitsivat HOXC8-geenin toimivan tärkeänä solujakautumisen ja apoptoosin transkriptiofaktorina, embigiinin ollessa yksi sen kohdegeeni. HOXC8-proteiinin todettiin tarttuvan embigiinin geenin promoottoriin ja vähentävän sen ilmentymistä. Embigiini puolestaan estää rintasyöpäsolujen jakautumista sekä lisää solujen riippuvuutta soluväliaineeseen. Embigiinin määrän laskun todettiin johtavan huonompaan prognoosiin. HOXC8 on homeobox-perheen geeni, joilla on useita fysiologisia rooleja muun muassa hiiren embryogeneesissä sekä ihmisen tuumorigeneesissä. Se esiintyy vahvasti etenkin alkion mesodermisissä. (Chao ja muut 2015). Kokeissaan Jung ja muut puolestaan huomasivat embigiinin hiljennyksen vaikuttavan moniin prosesseihin. Embigiinin hiljennys vähensi matriksin metalloproteaasien (MMP) 2 ja 9 aktiivisten muotojen eritystä BxPC-3 ja HPAC -soluissa. Lisätodisteita embigiinin vaikutuksista solujen EMT:hen saatiin, kun embigiinihiljennyksen havaittiin laskevan EMT:n kannalta oleellisten geenien ilmenemistä: PI3K, GSK3- β ja Snail/Slug -geenien ilmeneminen väheni hiljenemisen seurauksena. (Jung ja muut 2016)

1.3.3 Neuroplastiini on kolmas basigiinisuperperheen proteiini

Neuroplastiini on kolmas ja viimeinen basigiiniperheen proteiini basigiinin ja embigiinin lisäksi. Neuroplastiini esiintyy kahdessa isomuodossa, Np65 ja Np55. Näistä Np 65:llä on kolme immunoglobuliinidomeenia ja Np55:llä kaksi. Glykoproteiinit havaittiin ensin hiirillä, joissa Np65:n ulointa immunoglobuliinidomeenia lukuun ottamatta näiden kahden version peptidiketjut ovat identtiset ja Proteiinit tuottuvat samasta geenistä vaihtoehtoisella silmukoinnilla. Immunoglobuliinidomeeneita seuraa 21 aminohapon solukalvon läpäisevä osa, jonka jälkeen on 34 aminohapon solunsisäinen domeeni. Ihmisillä molemmat isomuodot esiintyvät kahtena versiona; proteiinissa voi olla 4 happaman aminohapon insertti solunsisäisessä osassa, tai se voi puuttua. Neuroplastiini on basigiinin kanssa hyvin samankaltainen, ja näillä kahdella proteiinilla on 40-45 % prosentin sekvenssi-identtisyys: Niiden solukalvon läpäisevässä osassa ja solunsisäisissä osissa on enemmän samankaltaisuutta. (Beesley ja muut 2014).

Neuroplastiini Np65 ja Np55 esiintyvät eri aluilla. Np 65 on spesifinen aivokudokseen sekä neuroneihin, Np55:n esiintyessä laajemmin. Np65 sijoittuu aivoissa voimakkaimmin etuaivojen alueelle, jossa sitä esiintyy neuroneissa aivokuoren, hippokampuksen ja aivojuovien alueilla. Se esiintyy heikommin keskiaivoissa, ja hyvin pienissä määrin aivorungossa. Np55:n esiintyminen aivoissa on tasaisempaa. Molemmat neuroplastiinin muodot esiintyvät neuroneissa pääasiassa synapseissa tai niiden välittömässä läheisyydessä. (Beesley ja muut 2014)

Nimensä mukaisesti neuroplastiineilla on tärkeä rooli hermosolujen toiminnassa, jossa ne ovat etenkin osana neuronien uusien dendriittien ja aksonien synnyssä. Neuroplastiini myös avustaa joitain GABA-siirtäjäproteiinin alatyyppejä sijoittumaan oikeaan paikkaan solukalvolla. Myös neuroplastiinilla on rooli energia-aineenvaihdunnassa neuroneissa, joissa se basigiinin ja embigiinin tapaan on MCT-proteiinien, etenkin MCT2-proteiinin, avustajaproteiini. (Beesley ja muut 2014). Neuroplastiinin hermostolle tärkeiden roolien takia sen muutokset ja geneettiset häiriöt ovat riskitekijöitä aivoperäisille ongelmille; neuroplastiinin geenimuutokset on yhdistetty henkisen kehityksen häiriöihin sekä kohonneeseen skitsofreniariskiin.

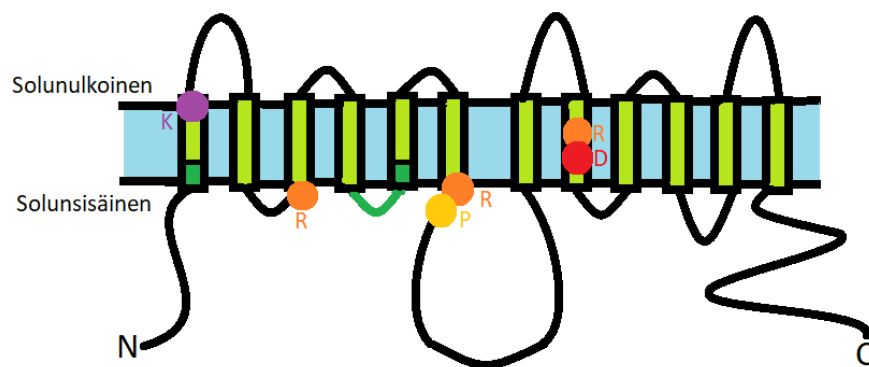
1.4 MCT-proteiiniperhe solujen aineenvaihdunnassa

1.4.1 MCT-proteiiniperhe siirtää ravinteita ja kuona-aineita solukalvon läpi

Aineenvaihdunta eli ravinteiden ja kuona-aineiden siirto on eläville soluille välttämätön ja jatkuva prosessi. Selvitäkseen solut vaativat jatkuvasti energiaa ympäristöstään ja vastaavasti niiden on jatkuvasti poistettava tarpeettomia ja haitallisia aineita. Monetkaan molekyylit eivät kuitenkaan kykene läpäisemään sähköisesti varautunutta ja keskeltä hydrofobista solukalvoa itsestään, eikä molekyylien täysin vapaa ja epäselektiivinen vaihto olisikaan solun kannalta edullista. Siksi ravinne- ja kuonamolekyylien siirtoon kalvon läpi tarvitaan proteiineja, jotka mahdollistavat molekyylien kulun. Proteiinit voivat muodostaa kanavia, jotka päästävät tiettyjä aineita lävitseen gradienttiensa mukaisesti tai siirtäjäproteiineja, jotka voivat selektiivisesti siirtää tiettyjä molekyylejä joko gradienttiensa mukaan, tai gradienttejaan vastaan.

Monokarboksylaattien siirtäjäproteiinit, MCT:t, ovat perhe solukalvon läpäiseviä proteiineja, jotka kuljettavat tyypillisesti pienikokoisia ravinteita ja kuona-aineita solukalvon läpi. Perheessä on useita jäseniä, jotka ovat rakenteeltaan ja toiminnaltaan samankaltaisia: tällä hetkellä niitä tiedetään olevan ainakin 14. Eri MCT-proteiinit eroavat toisistaan muun muassa substraattispesifisyyksiensä sekä proteiinivuorovaikutuksiensa suhteen. MCT-proteiinit kuuluvat suurempaan liukoisten aineiden kantajaproteiiniryhmään (engl. *solute carrier protein*, SLC). (Halestrap ja Price 1999 (katsausartikkeli); Wilson ja muut 2005; Mannowetz ja muut 2012; Muramatsu 2016 (katsausartikkeli)).

Kaikkien MCT-proteiinien perusrakenne on samankaltainen (kuva 2). Yksi yhtenäinen proteiiniketju läpäisee solukalvon 12 kertaa, sekä N- että C-terminuksen ollessa solukalvon sisäpuolella. Solunläpäisevien osien 6 ja 7 välissä on tyypillisesti pidempi solunsisäinen osa. Solunläpäisevät osat ovat melko identtisiä keskenään. Vaihtelu eri MCT-proteiinien välillä esiintyy pääasiassa C- ja N-terminuksissa sekä solunläpäiseviä osia yhdistävissä osissa. Proteiineissa on vain vähän glykosylaatiolle sopivia paikkoja, eikä proteiinien yleisesti uskota olevan glykosyloituja. Tämä on kokeellisesti osoitettu joillakin perheen proteiineilla. (Carpenter ja muut 1996; Wilson ja muut 1998).



Kuva 2. MCT -proteiinien kaavamainen rakenne. MCT-proteiineille yhtenäistä on 12 solukalvon läpäisevää domeenia (vaaleanvihreä). Kalvon läpäisevien alueiden 6 ja 7 välissä on suurempi solunsisäinen alue. Lisäksi N ja C -päässä on pidemmät solunsisäiset alueet, muiden solunläpäisevien alueiden yhdistävien osien ollessa lyhyempiä. Tietyt alueet ja yksi solunsisäinen alue (tummanvihreä) ovat vahvasti konservoituneita. Lisäksi tietyt aminohappotähteet (merkitty palloilla) ovat vahvasti konservoituneita.

MCT-proteiinien ei ole todettu olevan kytkettyjä mihinkään energiaa kuluttavaan prosessiin kuten ATP:n hajotukseen. MCT1:n on todettu toimivan symporttina, eli kuljettavan negatiivisesti varattuja monokarboksylaatteja yhdessä positiivisen protonin kanssa. Vaihtoehtoisesti se voi myös toimia antiportterina, jolloin se vaihtaa yhden karboksylaatin toiseen. Nettovaraukset solun sisällä ja ulkona eivät kummassakaan tapauksessa muutu. Muiden MCT-proteiinien oletetaan toimivan samankaltaisesti; ainakin MCT1:n tapauksessa monokarboksylaattien vaihdon on havaittu olevan nopeampaa kuin karboksylaatin siirto protonin yhteydessä. (Deuticke 1982 (katsausartikkeli); Carpenter ja Halestrap 1994).

Vaikka MCT-proteiineja tiedetään olevan ainakin 14 (MCT1-14), tunnetuimpia MCT-perheen jäseniä ovat MCT1 (SLC16A1), MCT2 (SLC16A7) JA MCT4 (SLC16A3). Näiden kuljettajaproteiinien substraattijoukot ovat samankaltaiset ja kaikki siirtävät yhtenä tärkeänä substraattinaan laktaattia, etenkin L-laktaattia. K_m -arvot eroavat kuitenkin suuresti (Taulukko 1). Näistä kolmesta pienin arvo on MCT2:lla, MCT4:n arvon ollessa ylivoimaisesti suurin. MCT1-arvo sijoittuu L-laktaatin suhteen näiden kahden väliin. (Bröer ja muut 1998; Bröer ja muut 1999; Dimmer ja muut 2000). MCT1 ja MCT4-proteiinien tiedetään esiintyvän pääasiassa avustajaproteiininsa basigiinin yhteydessä, kun MCT2 esiintyy pääasiassa avustajaproteiininsa embigiinin yhteydessä. Näiden avustajaproteiinien roolit ovat kuitenkin jokseenkin limittäiset; MCT1,2 ja 4 voivat esiintyä ja toimia myös toistensa avustajaproteiinien yhteydessä. (Perez-Escuredo ja muut 2016 (katsausartikkeli)).

Taulukko 1. MCT1,2 ja 4 -proteiinien substraattispesifisyydet yleisille substraateille (K_m -arvo). Arvoista voidaan huomata selkeä ero proteiinien välillä.

Monokarboksylaatti	MCT1	MCT2	MCT4
L-laktaatti	3.5-10 mM	0.5-0.75 mM	22-28 mM
Pyruvaatti	1.0 mM	0.08-0.1 mM	153 mM
Asetoasetaatti	5.5 mM	0.8 mM	216 mM
Hydroksibutyraatti	7.7-12.5 mM	1.2 mM	130 mM

1.4.2 MCT1, 2 ja 4 esiintyvät limittäin ja täydentävät toisiaan

Yleisesti sekä basigiini että sen yhteydessä tyypillisesti esiintyvät MCT1 ja 4 ovat yleisiä monissa eläimissä. Embigiini ja MCT2 ovat vastaavasti huomattavasti harvinaisempia. Muiden MCT-proteiinien esiintyvyys on huonommin tunnettua. (Pierre ja Pellerin 2005 (katsausartikkeli); Halestrap 2013 (katsausartikkeli); Perez-Escuredo ja muut 2016 (katsausartikkeli)).

Energia-aineenvaihdunta on hyvin vaihtelevaa tahdonalaisissa luurankolihaksissa. Kovassa rasituksessa lihasten energiantarve usein kohoaa korkeammaksi kuin mitä yksilön hapenottokyky pystyy oksidatiivista fosforylaatiota ylläpitämään, minkä takia suuri osa energiaa tuotetaan glykolyysillä. Monet lihassolut, niin kutsutut valkoiset lihassolut, eivät sisällä suuria määriä mitokondrioita, joten niiden oksidatiivinen energiantuottokyky on jo lähtökohtaisesti heikko. Glykolyysi tuottaa negatiivisesti varautunutta laktaattia, joka kerääntyessään laskee solun pH-arvoa ja estää solun aineenvaihduntaa. Tästä syystä laktaatin siirto lihassoluista on tärkeää sen toiminnan takaamiseksi. MCT1 ja MCT4-proteiinien onkin havaittu esiintyvän sekä rottien että ihmisten luurankolihasten solukalvoilla (Jackson ja muut 1995; Gawantka ja muut 1998; Cuff ja Shirazi-Beechey 2002). MCT4:n korkea K_m -arvo on erityisen otollinen siirtämään suuria määriä laktaattia pois soluista. MCT1-proteiinien pienempi kapasiteetti on otollisempi laktaatin sisäänottoon. MCT1:n rooli laktaasin sisään ottajana oksidatiivisiin soluihin ja MCT4:n rooli laktaasin poistajana on mahdollista ja tätä tukevat jotkut löydökset. Tämä roolijako ei kuitenkaan ole täysin varma tai yksiselitteinen. (Halestrap ja Price 1999 (katsausartikkeli))

Sydänlihaksen energia-aineenvaihdunnan jatkuvuus on yksilölle välttämätöntä ja Monokarboksylaattien kuten laktaatin, hydroksybutylaatin ja asetaatin siirto on sydämelle tärkeää. Sydän kykenee hapettamaan näitä molekyylejä energiakseen hapellisissa oloissa. Poikkeustiloissa, kun sydämen hapensaanti on estynyt, sydänlihasten on vastaavasti tuotettava energiaa glykolyttisesti, jolloin laktaatti on poistettava soluista. Ainakin MCT1:n on todettu esiintyvän sydänlihaksen soluissa sekä

ihmisessä, että rotassa. Muiden MCT-proteiinien esiintyvyys sydämessä on vähemmän varmaa. (Halestrap ja Price 1999 (katsausartikkeli)).

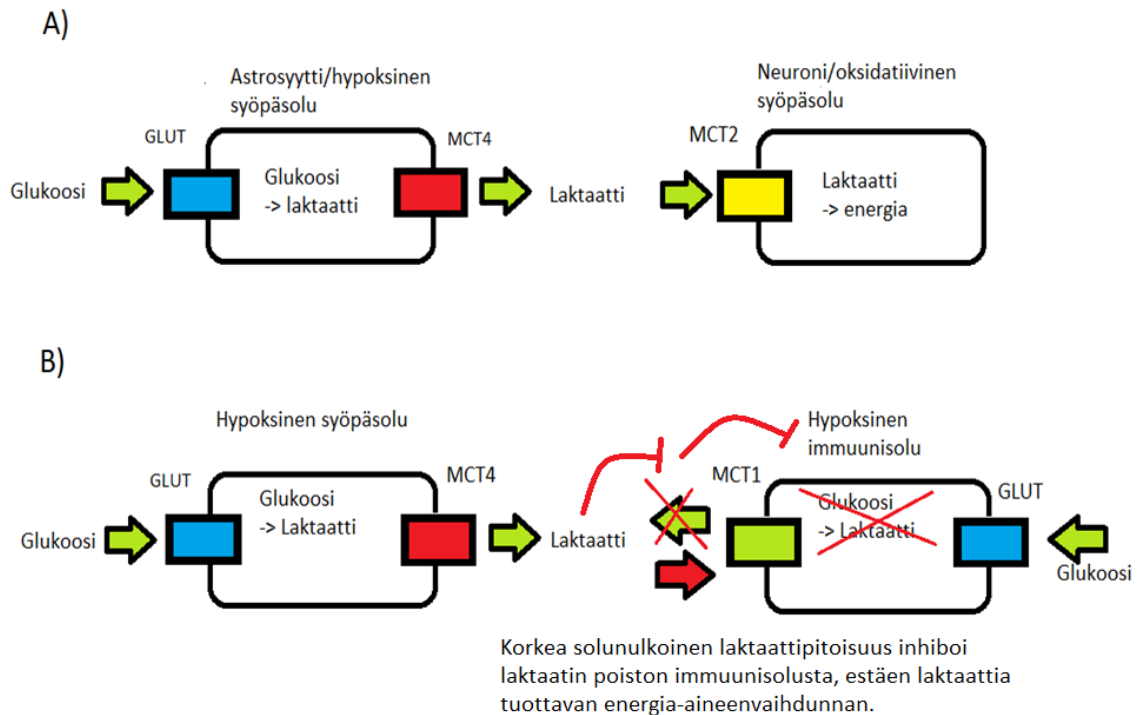
Aiemmin laktaatin oletettiin olevan aivoille vain hyödytön kuona-aine, eikä MCT-proteiinien rooleja aivoissa tunnettu kunnolla, tai edes pidetty mielekkäänä tutkia. Nykyään kuitenkin tiedetään, että tietyt aivojen solut käyttävät laktaattia energia-aineenvaihduntaansa, joihin solut tarvitsevat MCT-proteiinien läsnäoloa (kuva 3 A). Laktaatin on havaittu suojaavan neuronien toimintaa jopa iskeemisissä tai glukoosivajaissa olosuhteissa. Jyrsijöissä tehdyt kokeet ovat viitannet glukoosin ja laktaatin erilaiseen käyttöön eri aivojen soluissa. Mallin mukaan neuroneja tukevat astrosyytit käyttävät glukoosia enemmän kuin neuronit, jotka puolestaan hapettavat astrosyyttien tuottamaa laktaattia energiakseen. Mallia kutsutaan jossain yhteyksissä ”astrosyytti-neuroni laktaattisukkulaksi”. (Pierre ja Pellerin 2005 (katsausartikkeli); Perez-Escuredo ja muut 2016 (katsausartikkeli)).

Aivojen astrosyytti-neuroni laktaattisukkulun toiminnalle ovat oleellisia MCT siirtäjäproteiinit ja proteiinit muista proteiiniperheistä. Glutamaatin siirtäjäproteiinit GLAST ja GLT1 kykenevät siirtämään glutamaattia astrosyytteihin, jotka tuottavat siitä runsaasti laktaattia. (Pierre ja Pellerin 2005 (katsausartikkeli); Perez-Escuredo ja muut 2016 (katsausartikkeli)). MCT1-proteiinit siirtävät laktaattia ulos soluista; MCT4-proteiini tukee laktaatin poistoa soluista, kun sen tuotto on poikkeuksellisen korkeaa. MCT2-proteiinin ilmentyminen jyrsijöiden neuroneissa mahdollistaa laktaatin tehokkaan sisäänoton astrosyytteihin, jotka hapettavat sen energiaksi. Tässä mallissa MCT1, 2 ja 4 -proteiinien yhteistoiminta aikaansaa tehokkaan laktaattisukkulun. Eri solutyyppeiden lisäksi MCT1 ja 2-proteiinien on havaittu ilmenevän eroavasti jyrsijän aivoissa; MCT1 esiintyy tasaisesti kaikkialla aivoissa, kun taas MCT2 rajoitetummin, ilmentyen vahvasti vain hippokampuksessa, aivokuoressa sekä pikkuaivoissa. (Pierre ja Pellerin 2005 (katsausartikkeli); Perez-Escuredo ja muut 2016 (katsausartikkeli)).

Koska energia- ja kuona-aineenvaihdunta on oleellinen prosessi kaikissa soluissa, ovat MCT-proteiinit usein oleellisia myös syövässä. MCT-proteiinit ovat tärkeitä monissa syöpätyypeissä, kuten rintasyövässä, virtsarakon syövässä ja munasarjan syövässä.

(Halestrap 2013 (katsausartikkeli); Perez-Escuredo ja muut 2016 (katsausartikkeli)). On esitetty, että aivojen astrosyytti-neurosyytti laktaattisyklin tapaan myös syöpäsolut voivat siirtää ravinteita keskenään. Hapettomissa oloissa olevat syöpäsolut tuottavat energiaa glukoosista lähinnä glykolyysin avulla, jonka jälkeen laktaatti poistetaan soluista. Hapekkaissa oloissa olevat syöpäsolut puolestaan ottavat laktaattia oksidatiiviseen energiantuottoon. Laktaatin on lisäksi osoitettu olevan transkriptiofaktorin HIF-1 (hypoksian aktivoiva tekijä, engl. *hypoxia inducible factor*) aktivoija; laktaatin korkea pitoisuus voi muista tekijöistä riippumatta aktivoida hapensaantia parantavia reaktioiteita kuten angiogeneesiä, eli uusien verisuonien syntyä. Laktaatti voi näin muokata syöpäsolujen ympäristöä niille ja niiden leviämislle suotuisammaksi. (Dhup ja muut 2012 (katsausartikkeli); Corbet ja muut 2014)

MCT-proteiineilla on myös tärkeä rooli syövän immunosupressiossa (kuva 3 B). Monet lymfosyytit tuottavat energiansa vain hapettomasti glykolyysin avulla. Niiden GLUT-siirtäjäproteiinit ottavat glukoosia verestä, josta lymfosyytit tuottavat energiaa glykolyysillä. Syntyvä laktaatti poistetaan lähinnä MCT1-proteiinien kautta. Koska MCT-proteiinit ovat kaksisuuntaisia, solut eivät pysty poistamaan laktaattia tehokkaasti, jos sen konsentraatio solun ulkopuolella on korkea. Glykolyttiset syöpäsolut voivat vastaavasti ottaa sisään glukoosia, ja poistaa sitä MCT1 tai MCT4-proteiinien kautta. Etenkin MCT4-proteiinin kapasiteetti on niin suuri, että syöpäsolu kykenee poistamaan suuria määriä laktaattia, joka puolestaan lisää ympäristön laktaattipitoisuutta suuresti, estäen laktaatin poiston immuunisoluista, tai jopa aiheuttaen laktaatin sisäänoton. Näin Immuunisolujen energia-aineenvaihdunta häiriintyy, eivätkä ne kykene normaaliin immuunipuolustukseen. (Perez-Escuredo ja muut 2016 (katsausartikkeli))



Kuva 3. MCT-proteiinien rooli ravinteiden kuljetuksessa solujen välillä. A) Astrosyytti tai hypoksinen solu ottaa ympäristöstään glukoosia. Hypoksisissa oloissa glukoosista tuotetaan energiaa vain glykolyysin kautta, tuottaen laktaattia, joka poistetaan solusta. Neuroni tai oksidatiivinen syöpäsolu ottaa laktaatin korkea-affiniteettisen MCT2-kantajaproteiinin avulla ja tuottaa siitä energiaa oksidatiivisesti. B) Hypoksinen syöpäsolu ja immuunipuolustuksen solu saavat molemmat glukoosia GLUT-kantajaproteiinin välityksellä. Molemmat tuottavat hypoksisissa oloissa energiaa vain glykolyysin avulla, tuottaen laktaattia. Laktaatti on poistettava soluista glykolyysin jatkumiseksi; Syöpäsolun korkean kapasiteetin MCT4-kantajaproteiini poistaa laktaatin tehokkaammin, haitaten immuunisolun laktaatin poistoa, estäen sen tehokkaan energiantuoton ja aiheuttaen sen inaktivoitumisen.

1.5 MCT- ja basigiini-perheen proteiinien vuorovaikutukset

1.5.1 MCT-proteiinit vaativat apuproteiinin toimiakseen

Basigiini-perheen proteiineilla on lukuisia tehtäviä soluissa viestien välittämisestä solujen adheesioon. Ne myös tarjoavat MCT-proteiinien toiminnalle välttämättömän kiinnittymispaikan solun kalvolla. Ilman tätä kiinnittymispaikkaa MCT-proteiinit eivät juurikaan esiinny solukalvolla. Vaikka MCT-proteiinien ilmeneminen itsessään voi vaihdella, on niiden avustajaproteiinien läsnäololla vähintään yhtä tärkeä rooli. Tämän takia basigiini-perheen proteiinit ilmenevät usein komplekseina MCT-proteiinien kanssa.

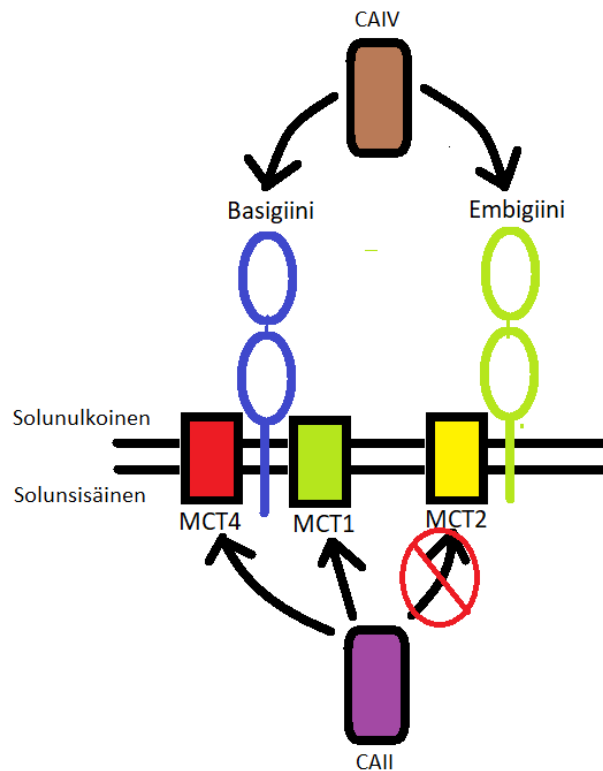
Tämä kompleksi vuorovaikuttaa myös muiden proteiinien tai molekyylien kanssa, jotka saattavat vaikuttaa kompleksin toimintaan. (Wilson ja muut 2005; Mannowetz ja muut 2012; Muramatsu 2016 (katsausartikkeli)).

MCT-proteiinit ja basigiiniperheen proteiinit esiintyvät usein yhdessä tiettyinä pareina. MCT1 ja 4 esiintyvät tyypillisesti basigiinin yhteydessä, MCT2:n esiintyessä pääasiassa embigiinin kanssa (Wilson ja muut 2005). MCT-proteiinit voivat kuitenkin esiintyä toistenkin basigiiniperheen proteiinien yhteydessä, etenkin niiden ensisijaisen proteiinin puuttuessa. Basigiini ja MCT1 ovat melko yleisiä, mutta embigiini ja MCT2 ovat etenkin ihmisessä huomattavasti harvinaisempia. Onkin tyypillistä, että MCT2 esiintyy basigiinin yhteydessä kudoksissa, joista embigiini puuttuu (Mannowetz ja muut 2012). MCT1 ja 4 voivat vastaavasti esiintyä embigiinin yhteydessä basigiinin puuttuessa (Wilson ja muut 2005).

1.5.2 Hiilihappoanhydraasit tehostavat MCT-proteiinien toimintaa apuproteiinien välityksellä

Hiilihappoanhydraasit (engl. *carbonic anhydrase*, CA) ovat joukko entsyymejä, jotka katalysoivat CO₂:n reversiibeliä hydraatiota HCO₃⁻ ja H⁺ -ioneiksi. Nisäkkäiden hiilihappoanhydraaseja tunnetaan 16 eri isomuotoa, jotka ovat pääasiassa monomeerisiä sinkki-metalloentsyymejä, kooltaan noin 30 Kda. Näistä isomuotojen 2 ja 4 (CAII ja CAIV) on osoitettu vaikuttavan MCT-proteiinien toimintaan nopeuttamalla metaboliittien siirtoa. Vaikka hiilihappoanhydraaseilla on vaikutus ionipitoisuuksiin kuten MCT-proteiinien toiminnalla, CA-proteiinien MCT-toimintaa tukeva vaikutus ei kuitenkaan tutkimuksien mukaan vaikuta olevan riippuvainen niiden katalyyttisestä aktiivisuudesta. Näistä kahdesta CAII on solunsisäinen ja CAIV solunulkoinen proteiini. (Klier ja muut 2011; Forero-Quintero ja muut 2019). CAIV:n on havaittu vaikuttavan sekä MCT1, MCT2 että MCT4-proteiineihin. CAII puolestaan vaikuttaa näistä kolmesta vain MCT1 ja MCT4-proteiineihin, vaikuttamatta MCT2:een. Solunulkoinen CAIV vaikuttaa MCT-proteiineihin niiden avustajaproteiinien eli embigiinin tai basigiinin välityksellä. CAII puolestaan kykenee liittymään suoraan MCT1 ja MCT4-proteiinien solunsisäisiin

osiin, toisin kuin MCT2-proteiiniin (kuva 4). (Klier ja muut 2011; Forero-Quintero ja muut 2019).



Kuva 4. Solunulkoinen CAIV vaikuttaa MCT-proteiineihin basigiinin ja embigiinin välityksellä. Solunsisäinen CAII puolestaan liittyy suoraan MCT1 ja 4 -proteiinien solunsisäisiin osiin. MCT2:lta tämä osa puuttuu, joten CAII ei vaikuta sen toimintaan.

1.5.3 MCT-proteiinien toimintaa voidaan estää inhiboimalla niiden apuproteiineja

Koska MCT-proteiinit vaativat avustajaproteiinin toimiakseen, tämän avustajaproteiinin puuttuminen tai kyvyttömyys toimia MCT:n avustajaproteiininä estää tehokkaasti MCT-proteiinien toimintaa. Yksi esimerkki tällaisesta epäsuorasta inhibitiosta on Basigiinin inhibitio käyttämällä orgaanista elohopeayhdistettä, *p*-kloroelohopeabentseenisulfonaattia (engl. *p*-chloromercuribenzene sulfonate, *p*CMBS). (Wilson ja muut 2005). *p*CMBS on solukalvoa läpäisemätön, tiolien kysteiinitähteitä muokkaava reagenssi. Joillain MCT-proteiineilla, kuten MCT4:llä, on vapaita kysteiinitähteitä, mutta *p*CMBS ei vaikuta näihin. Vaikka embigiini ja basigiini ovat samankaltaisia proteiineja, on niillä eroja niiden rakenteessa, mukaan lukien niiden disulfidisilta-rakenteissa. Embigiinissä on kaksi Immunoglobuliinin kaltainen V -

domeenia, joissa disulfidisillat ovat tärkeä osa rakennetta. Basigiinissa on puolestaan yksi immunoglobuliininkaltainen I -domeeni sekä yksi immunoglobuliininkaltainen CD2 -domeeni. Tämä jälkimmäinen domeeni on *pCMBS*:n sitoutumisalue. *pCMBS* häiritsee disulfidisillan rakennetta ja estää näin proteiinin toiminnan. (Wilson ja muut 2005). Koska MCT1 ja -4 esiintyvät pääasiassa embigiinin yhteydessä, *pCMBS* inhiboi niitä epäsuorasti estämällä basigiinin toiminnan. Koska MCT2 puolestaan esiintyy tyypillisesti embigiinin yhteydessä, *pCMBS*:llä ei usein ole siihen vaikutusta. Vastaavasti hiljentämällä basigiinin tai embigiinin geenien ilmeneminen voidaan epäsuorasti häiritä niistä riippuvaisten MCT-proteiinien toimintaa. (Wilson ja muut 2005).

MCT-proteiinien spesifinen hiljennys voi olla haastavaa. Etenkin MCT-proteiinien spesifinen häiritseminen voi olla vaativaa. Näiden proteiinien apuproteiinien häiritseminen niille spesifisillä inhibiittoreilla tai hiljennyksellä on yksi tapa estää tiettyjen MCT-proteiinien toiminta, sillä basigiinin inhibition ei teoriassa pitäisi vaikuttaa suuresti MCT2:n toimintaan, ja vastaavasti basigiinin hiljennyksen ei pitäisi vaikuttaa MCT1 tai -4 -proteiineihin suuresti. Tätä basigiinin ja embigiinin vaikutusta MCT-proteiinien toimintaan ja solujen aineenvaihduntaan tarkasteltiin lisää tehdyissä kokeissa.

2 Tutkimuksen tavoitteet

Kokeissa MCT- ja adheesioproteiinien välistä vuorovaikutusta pyrittiin tutkimaan, etenkin MCT2:n ja embigiinin osalta, painottaen embigiinin ja MCT -proteiinien vuorovaikutuksen vaikutusta solujen aineenvaihduntaan. Kokeissa etsittiin sopiva, MCT- ja adheesioproteiineja ilmentävä solulinja, jonka solujen embigiinin, basigiinin tai molempien ilmentymistä hiljennettiin. Hiljennyksen vaikutuksia MCT-proteiineihin ja solujen aineenvaihduntaan tarkasteltiin mittaamalla solujen hapenkulutusta ja mediumin happamoitumista, jotka molemmat ovat energia-aineenvaihdunnasta riippuvaisia prosesseja. Näin pyrittiin Saamaan lisätietoa sekä lisävarmistusta näiden proteiinien yhteistoiminnasta. Tämä tieto on tärkeää sekä yleisen solumetabolian ymmärryksen kannalta, että monien tautien, kuten syöpien, mahdollisten uusien hoitotapojen kehittämisen kannalta. (Chothia ja Jones 1997 (katsausartikkeli); Halestrap ja Price 1999 (katsausartikkeli); Wilson ja muut 2005; Halestrap 2013 (katsausartikkeli); Chao ja muut 2015; Muramatsu 2016 (katsausartikkeli)).

Oikeanlaisten, embigiiniä ja MCT -proteiineja sisältävien solujen lisäksi metaboliakokeita varten vaadittiin myös keino muokata embigiinin määrää soluissa, jotta saataisiin eri solupopulaatioita, joissa ei olisi muuta eroa kuin eri määrät embigiiniä solujen pinnalla. Mahdollisia menetelmiä olivat inhibiittorit, embigiinin ilmenemistä lisäävän vektorin transfektio, tai embigiinin hiljennys soluista. Ilmenemistä lisäävän vektorin tapauksessa olisi todettava, että vektori todella lisää embigiinin ilmenemistä, etenkin solujen pinnalla. Vastaavasti hiljennyksen käyttö vaatisi kyvyn osoittaa, että hiljennys todella vähentää proteiinin määrää solukalvolla.

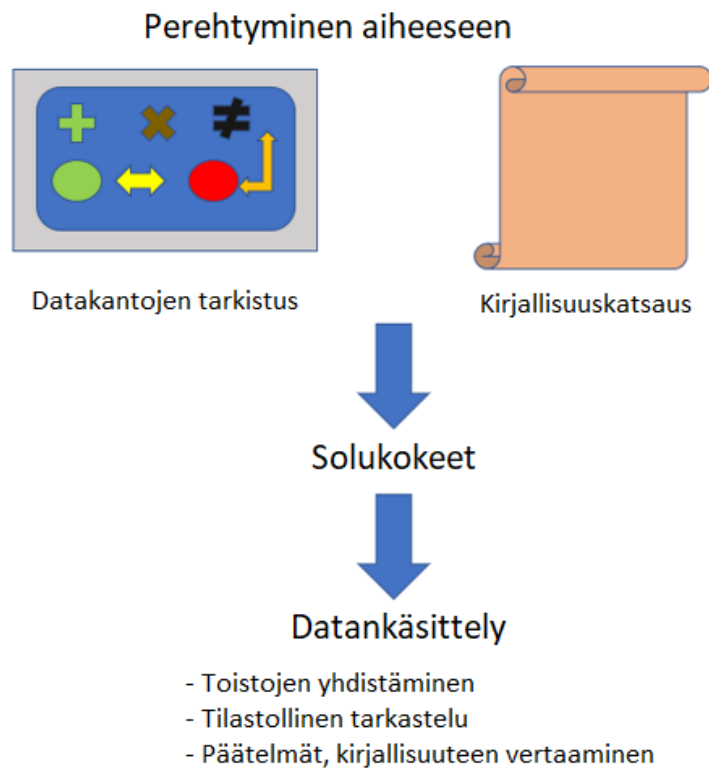
Varsinaisiin metaboliamittauksiin valittiin Agilent seahorse -laite, joka mittaa solujen kasvatusmediumin hapenkulutus- ja pH-muutoksen nopeutta. Koska nämä ovat molemmat yhteydessä solujen aineenvaihduntaan, tämä katsottiin kokeisiin soveltuvaksi menetelmäksi. Embigiinin tutkiminen oli kokeiden pääkohde, jota paremmin tunnetun basigiinin tarkastelu tuki.

Embigiinin vaikutusta etenkin solujen aineenvaihduntaan tutkittiin häiritsemällä embigiinin ilmentymistä, basigiinin ilmentymistä, sekä molempien ilmentymistä samanaikaisesti. Lisäksi pyrittiin tarkastelemaan soluväliaineen vaikutusta lisäämällä solut kaivoihin, jotka olivat ennakkoon päällystetty soluväliaineessa yleisillä proteiineilla, kollageenilla, laminiinilla, fibronektiinillä, joiden kanssa embigiinin uskotaan vuorovaikuttavan, sekä polylysiinillä, jonka ei uskota vuorovaikuttavan embigiinin kanssa. Yleisenä tavoitteena on siis muodostaa parempi kuva embigiinin, basigiinin, MCT-proteiinien sekä soluväliaineen proteiinien vuorovaikutuksesta keskenään.

Embigiinin uskotaan vaikuttavan monilla tavoilla, sekä aineenvaihdunnan että erilaisten soluväliaine ja viestimekanismien avulla. Embigiinin oikea toiminta on tärkeää terveissä kudoksissa ja väärä toiminta osatekijä monissa taudeissa. Näistä syistä embigiinin toiminnan ymmärtäminen on tärkeää yleisen elämän ymmärryksen kannalta, että erilaisten tulevaisuuden hoitomenetelmien kannalta. Jopa syöpä- tai kantasoluthoidotkin saattavat hyötyä embigiinin ja siihen liittyvien proteiinien laajemmasta tuntemisesta.

Tutkimuksen tavoitteet (kuva 5):

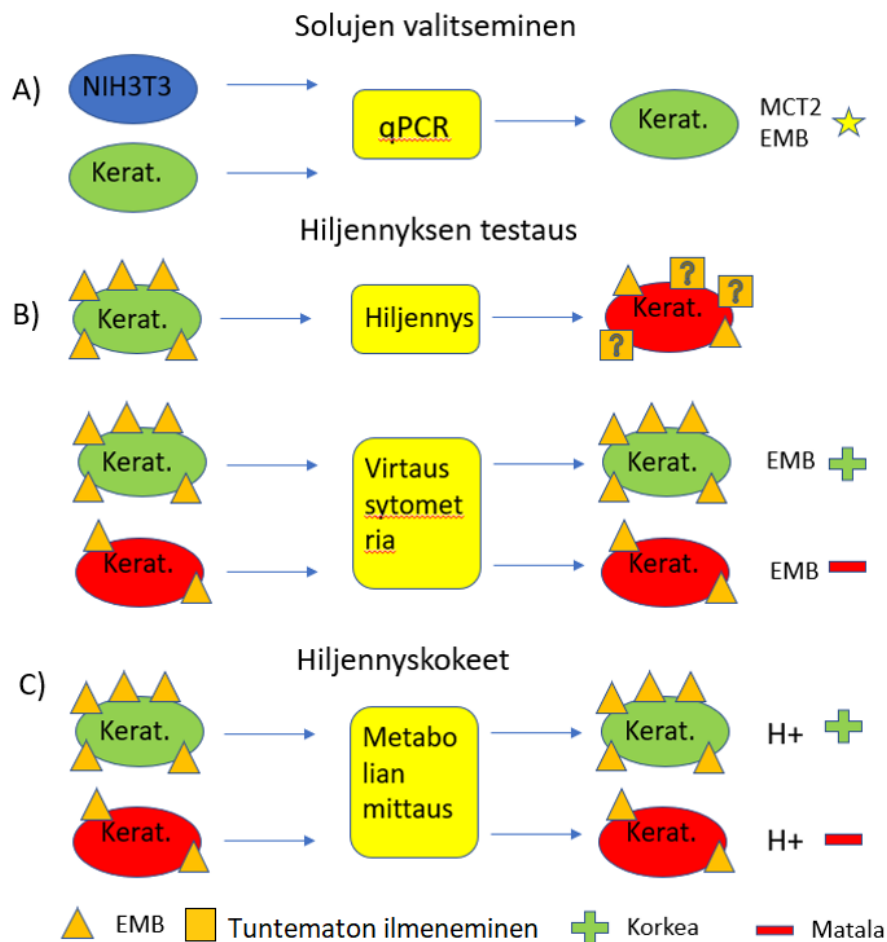
- 1. Löytää sopiva ainakin embigiiniä, basigiinia ja MCT2:ta ilmentävä solulinja.**
- 2. Löytää ja varmistaa toimiva tapa muokata embigiinin määrää ja etenkin embigiinin määrää solujen pinnalla.**
- 3. Tarkastella embigiinin ja muiden vastaavien proteiinien vaikutusta solujen aineenvaihduntaan mittaamalla aineenvaihdunnasta riippuvaisia prosesseja kohdeproteiinien toimintaa muokatessa.**



Kuva 5. Yksinkertaistettu kokeen työnkulku. Aihe taustoitettiin kirjallisuuskatsauksella sekä tietokantojen tarkastelulla ennen itse kokeita. Lopulta kokeista saatu data yhdistettiin tilastollisesti pätevän tuloksen saamiseksi.

3 Materiaalit ja menetelmät

Työssä tärkeintä oli tuottaa lisätietoa embigiinin vaikutuksista soluaineenvaihduntaan. Työtä varten aihe taustoitettiin kirjallisuuskatsauksella sekä datakantojen tarkastelemisella. Tämän jälkeen etsittiin sopivat solut sekä sopiva embigiinin ilmenemisen häiritsemismenetelmä ja tehtiin hiljennyskokeet siRNA-transfektioilla (kuva 6.). Lopuksi eri toistoista saadut tulokset yhdistettiin ja tarkasteltiin.



Kuva 6. Solukokeiden työkulku. A) Solutöiden yksinkertaistettu työkulku. Soluvaihtoehtojen geenien hiljentämisen onnistuminen tarkastettiin qPCR:llä. Sopivan embigiini ja MCT2-ilmenemisen perusteella valittiin hiiren keratinosyyttisolut. B) Keratinosyytit hiljennettiin vasta-EMB-siRNA:lla. Hiljennettyjen ja hiljentämättömien solujen pintaembigiini värjättiin niiden embigiinin pintaillenemisen tarkastelemiseksi. C) Hiljennettyjen ja hiljentämättömien solujen metaboliaa tarkasteltiin yhdessä samoissa olosuhteissa.

3.1 Tietokannat

Työtä varten tarkasteltiin erilaisia tietokantoja etenkin embigiinin osalta. Tarkastellut tietokannat olivat The Human Protein Atlas (proteinatlas.org), Genevestigator (Genevestigator.com), PROGene, sekä niiden viittaamat muut tietokannat. Näistä datakannoista katsottiin etenkin tietoa embigiinistä liittyen sen esiintymiseen geeni- ja proteiinitasolla eri kudoksissa ja soluissa, sekä embigiinin vaikutuksesta erilaisissa tautitiloissa. Lisäksi tarkasteltiin embigiinin määrän vaihtelua eri lajien, pääasiassa ihmisen ja hiiren, välillä.

Embigiinin lisäksi tarkasteltiin muiden oleellisten proteiinien esiintymistä, kuten tutkimuksen kannalta oleellisten MCT-proteiinien sekä basigiinin esiintymistä ja toimintaa. Yleisesti pyrittiin muodostamaan yleiskuva embigiinin ja sen kannalta olennaisten proteiinien toiminnasta ja esiintyvyydestä.

3.2 Solulinjat ja kasvatus

Kokeita varten testattiin kahta eri solutyyppiä, hiiren NIH 3T3 -fibroblastisoluja sekä hiiren IMBCA -keratinosyyttisoluja (Solut Thermo Fisher scientific). NIH 3T3 -soluista testattiin kolme populaatiota, jotka olivat NIH 3T3 -villityyppi, NIH 3T3 PCDNA 3.1 (invitrogen), johon transfektoitu tyhjä vektori, sekä NIH3T3 EMB/PCDNA, johon transfektoitu hiiren embigiini-yliekspressiovektori. NIH 3T3 -solut kasvatettiin DMEM (Dulbeccos's modified Eagle's medium, Gibco, Thermo Fischer scientific) + 10 % naudan sikiön seerumi (engl. *Fetal calf serum*, FCS) -mediumilla, johon lisätty 2 mM L-glutamiini (Lonza), 100 U/ml penisilliini, 100 µg/ml streptomysiini (Sigma-Aldrich). Keratinosyytit kasvatettiin FAD-mediumilla, joka tehtiin käyttäen DMEM-mediumia pohjana seuraavasti: 375 ml DMEM, 125 ml F12 Nutrient mix (Gibco Ref 21765-029, Thermo Fischer scientific), 10 % FCS, 33 mg/L Adeniini, 500 µg/L hydrokortisoni, 8,4 µg choleratoxin (Sigma C8052), 10 µg/L EGF (engl. *epidermal growth factor*, Sigma E5036-200 µg), 500 µl Ihmisen insuliini (engl. *Insulin human solution*, Sigma 19278-5 ml), 10 ml/L ultraglutamiini (Ultraglutamine1, Lonza cat BE17-605E/U1m), 10 ml/L Pen/strep (Lonza cat DE17-602E). Kaikki solut kasvatettiin 10 cm Maljoilla, joilla 10 ml mediumia.

Solut pidettiin soluviljelykaapissa, jonka lämpötila oli 37 °C ja hiilidioksidipitoisuus 5 %. Solut irrotettiin siirtoa varten maljoilta trypsiinillä (Lonza, BE17-160E) johon lisätty 500 µg/L K-EDTA.

3.3 Geenien ilmeneminen määritettiin qPCR:llä.

Oleellisten geenien ilmenemisen mittausta varten solujen RNA eristettiin RNA-kitillä valmistajan ohjeiden mukaan (QIAGEN RNeasy RNA-eristyskitit) Eristetty RNA käännettiin komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) SensiFAST cDNA Synthesis Kit (meridian bioscience) – kitillä ohjeiden mukaisesti, käyttäen maksimimäärää RNA:ta eli 1 µg. Kääntöä varten asetettiin cDNA-synteesiohjelma ohjeen mukaisesti: 25 °C 10 min, 42 °C 15 min, 85 °C 5 min 4 °C säilytys. Saatua cDNA:ta käytettiin haluttujen geenien ilmentymisen mittaukseen kvantitatiivisellä PCR:llä eli qPCR:llä. Käytetty metodi oli geenille spesifinen Taqman. Halutuille hiiren geeneille suunniteltiin alukkeet (taulukko 2.) ja fluoresiini (FAM) leimatut koettimet. Koettimet ja alukkeet hankittiin Roche Life Science -yritykseltä, jonka Universal ProbeLibrary Assay Design Center -sovelluksella ajo suunniteltiin. Kaikista neljästä solupopulaatiosta (keratinosyytit, NIH3T3, NIH3T3 + tyhjä vektori sekä NIH3T3 + embigiiniä ylimäärin ilmentävä vektori) testattiin MCT:t 1,2 ja 4 sekä embigiini ja β -aktiini (kontrolli). qPCR ajettiin ohjeen mukaisissa seoksissa niin, että jokaiseen 10 µl näytteeseen tuli TaqMan Universal Master Mix II 2X (Applied Biosystems) laimennettu ohjeen mukaan, 200 nM koetinta, 10 pM alukkeita sekä cDNA:ta sopivassa laimennoksessa. Kolme eri koetta tehtiin cDNA:n määrillä 100 µg, 200 µg ja 1000 µg. Lisäksi jokaisesta alukeparista ja koettimesta tehtiin negatiiviset kontrollinäytteet, joihin ei lisätty cDNA:ta. Ajot suoritettiin QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) -laitteella. Ajot suunniteltiin QuantStudio 12 K Flex -ohjelmalla.

Taulukko 2. qPCR-mittauksessa käytetyt alukkeet sekä Näitä alukkeita varten suunnitellut universal-probe koettimet. Keltaisella niiden MCT-proteiinien (MCT10 ja MCT13) koettimet, jotka olivat päällekkäiset. Tämä ei kuitenkaan vaikuta mittaukseen.

Proteiini	Geeni	Vasen aluke	Oikea aluke	Universal probe
Basigiini	BSG	ctggccttcacgctcttg	tggacagaggtttggatggt	#70 cat.no. 4688937001
Beta-akt.	Actb	ctaaggccaaccgtgaaaag	accagaggcatcacagggaca	#64, cat.no. 04688635001
Embigiini	EMB	gccatacttgccgaagtca	ttcaaattctttcccagcatc	#49, cat.no. 04688104001
MCT1	SLC16A1	ggatatcatctataatgttggctgtc	gctgccgtatttattcaccaa	#67, cat.no. 04688660001
MCT2	SLC16A7	aacacaaagtggttaggcttaaa	tcacctgactgatgtttctcttg	#77, cat.no. 04689003001
MCT4	SLC16A3	tgcagctcagttcttgggtga	gatgataaaaacagccaaagagga	#45, cat.no. 04688058001
MCT5	SLC16A4	ccattatgtcatcactccgtttc	ctctccaagtacgtcacagatga	#71 cat.no. 04688945001
MCT6	SLC16A5	ctcttcaccatcctgtgtgg	ggcttcttccagcagcaatc	#22 cat.no. 04686969001
MCT7	SLC16A6	gtcagcagagcgaaatgtca	tccatcaggcacttgggtat	#21 cat. No. 04686942001
MCT8	SLC16A2	gttggtatcctctactccatgctac	agaagaagatcatgcccatagc	#101 cat.no. 04692195001
MCT9	SLC16A9	cctcggcctgatttcaac	agcaggcagccatctagg	#89 cat.no. 04689143001
MCT10	SLC16A10	ccctcttcaaggagacaacct	ccttctctttacatggttcatca	#3 cat.no. 04685008001
MCT11	SLC16A11	gcctcctgcacctctacct	gacggcgggagaagtacc	#20 cat.no. 04686934001
MCT12	SLC16A12	tccattccattgtagactgtatgac	caggataactggttactgacaacac	#99 cat.no.
MCT13	SLC16A13	ctggtgcagatgatcgagag	gaagccgtgtagttgcctgt	#3 cat.no. 04685008001
MCT14	SLC16A14	cagccaatgtgcagtctctc	aggtaagccatcccactgc	#40 cat.no. 04687990001

Hiiren keratinosyyttien ilmentymisprofiili mitattiin erikseen laajemmin kuin NIH3T3-solujen, jolloin mittauksessa tarkasteltiin MCT1-2 ja 4-14 ilmentymistä, embigiinin, basigiinin sekä β -aktiinin (kontrolli) ilmentymistä. Mittaus suoritettiin samoin kuin edellä, cDNA:n ollessa 200 μ g kaikissa näytteissä.

3.4 Embigiinin hiljennys

Tutkimuksia varten embigiinin ilmentyminen hiljennettiin siLentFect reagent - reagenssilla (BioRad). Hiljennystä varten noin 50 % konfluentit solut laskettiin, ja 300 000 solua siirrettiin uudelle maljalle hiljennystä edeltävänä päivänä. Noin 15 minuuttia ennen transfektiota maljojen mediumi vaihdettiin 5 ml:aan tuoretta FAD-mediumia. Jokaista transfektoitavaa maljaa varten otettiin kaksi mikrosentrifuugiputkea, joihin laitettiin 250 μ l samaa mediumia. Yhteen putkeen lisättiin 8 μ l siLentFect -reagenssia ja toiseen 20 nM siRNA:ta loppukonsentraatioon 440 pM. Soluja transfektoitiin kolme populaatiota; negatiivinen kontrolli transfektoitiin Allstar antisense siRNA:lla (Qiagen ID: 1027281), jonka lisäksi kaksi muuta populaatiota transfektoitiin Emb1 ja Emb4 vasta-embigiini siRNA:lla (Qiagen Flexitube 20 nM siRNA).

SilentFect- ja siRNA-mikrosentrifuugiputkien sisällöt yhdistettiin ja sekoitettiin, jonka jälkeen annettiin inkuboida 20 min huoneenlämmössä. 500 µl Reaktioseos lisättiin hiiren keratinosyyttisoluille pisaroittain, jonka jälkeen solut siirrettiin soluviljelykaappiin n. 5 tunniksi. Tämän jälkeen medium poistettiin, solut pestiin PBS:llä ja soluille lisättiin 10 ml uutta mediumia kasvatusta varten.

3.5 Western blot

Embigiinin hiljennys todennettiin myös Western blot -menetelmällä. Tätä varten noin 80 % konfluenteiksi kasvaneet solut lysoitiin SDS-latauspuskuriin (62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2,5 % SDS, 10 % glyseroli, 1 % β -merkaptoetanol, 12,5 mM EDTA, 0,02 % bromifenolisininen). SDS-latauspuskurin lisäyksen jälkeen solut lämmitettiin 5 minuutiksi 98 celsiusasteeseen. Näytteet ajettiin 8 % SDS-PAGE -geelillä. Geeliä ajettiin ensin 60 V jännitteellä 30 min, jonka jälkeen geeli ajettiin loppuun 120 jännitteellä. (Biorad Transblot välineet, Biorad PowerPac HC virtalähde). SDS-Page:n jälkeen proteiinit siirrostettiin PVDF membraanille yön yli 40 V jännitteellä. Siirrostettu membraani estettiin 5 % maito-TBST -puskurissa ravistelussa noin 30 min. Tämän jälkeen lisättiin primääriset vasta-aineet 1:1000 rotan vasta-embigiini (Klooni G7.43.1, eBioscience) sekä 1:200 000 hiiren vasta β -aktiini (Invitrogen). Membraani pestiin 4 x 3 min TBST:llä. Tämän jälkeen lisättiin sekundääriset vasta-aineet 1:15 000 odyssey vasta-rotta 800 (IRDye® 800CW Goat anti-Rat IgG Secondary Antibody, LI-COR) sekä 1:15 000 Odyssey vasta-hiiri 680 (IRDye® 680RD Donkey vasta-Mouse IgG, LI-COR). Membraani pestiin 4 x 3 min TBST:ssä, jonka jälkeen membraani skannattiin Odyssey CLx -laitteella (LI-COR).

3.6 Virtaussytometria

Embigiinin ilmentymistä solujen pinnalla hiljennetyissä ja kontrollisoluissa tarkastettiin FACS -sytometriaa hyödyntäen (FACS, fluorescence-activated cell sorting, fluoresenssin aktivoima solujen erottelu). Mittausta varten kaksi päivää kasvaneet Allstar, Emb1 ja Emb4 -transfektoidut solut pestiin PBS:llä ja kaavittiin irti maljoista 1 ml:aan PBS:ää. Solut laskettiin automaattisella solulaskijalla (TC20 Automated Cell Counter, Biorad)

niin, että saatiin 300 000 solua/näyte. Oikea määrä soluja sentrifugoitiin 4 min 1800 rpm ja solupelletti resuspensoitiin 100 µl:aan kylmää puskuria (1 % FCS PBS) ja inkuboitiin soluja jäällä 30 min. Tämän jälkeen lisättiin soluille 7,5 ng/µl hiiren vasta-embigiini primäärivasta-ainetta (G7.43.1 EMB rat anti-mouse mAB, eBioscience, 0,5 mg/ml) puskurissa. Näytteitä inkuboitiin 1 h rauhallisessa sekoituksessa 4 celsiusasteessa. Näytteet sentrifugoitiin 4 min 1800 rpm 4 celsiusasteessa ja pelletti resuspensoitiin 100 µl:aan puskuria, johon lisätty 20 ng/µl vuohen vasta-rotta fluoresenssileimattua sekundäärivasta-ainetta (Alexa fluor 488 goat anti-rat IgG (H + L) 2 mg/mL, Invitrogen). Soluja inkuboitiin 30 min, jonka jälkeen ne pestiin lisäämällä 500 µl PBS:ää. Solut sentrifugoitiin kuten edellä ja pestiin uudestaan, jonka jälkeen ne resuspensoitiin 250 µl:aan PBS:ää mittausta varten.

Leimattujen solujen pintaembigiinin ilmeneminen mitattiin virtaussytometrilla (BD LSRFortessa, Bd Biosciences). Mittausta varten soluista valittiin sopiva populaatio, josta pyrittiin poistamaan hajonneet solut, roskat ja Kontrollisolut, Emb1 ja Emb4 -solujen Alexa fluor 488 -signaalit mitattiin pintaembigiinin määrän mittaamiseksi.

3.7 Metaboliamittaukset

Solujen metaboliamittaukset, eli solujen mediumin happamoitumisnopeuden mittaaminen, tehtiin Agilent Seahorse-laitteella, joka kykenee mittaamaan pH:n muutosta ja hapenkulutusta suoraan mediumista. Kokeissa käytettiin Seahorse XFe96-laitetta, sekä valmistajan materiaaleja, mukaan lukien 96-kuoppainen XF96 soluviljelymikrolevy, valmistajan mittauskasetti (Seahorse XFe96 Fluxpak mini, 102601-100) Valmistajan medium ja lisäravinteet sekä inhibiittoria sisältävät testikit (Seahorse XF Real-time ATP rate assay kit, 103591-100, Agilent Technologies) Mediumina käytettiin Seahorse XF DMEM mediumia, pH 7,4. Tähän perusmediumiin lisättiin Seahorse XF glukoosia konsentraatioon 10 mM, pyruvaattia konsentraatioon 1 mM sekä L-glutamiinia konsentraatioon 2 mM.

Kokeet tehtiin soveltaen valmistajan ohjeita. Kokeissa käytetyt solut transfektoitiin vasta-embigiini siRNA:lla (Emb1 tai Emb4) tai Allstar scramble epäspesifisellä siRNA:lla (kontrolli) 24 tuntia ennen niiden lisäämistä levyn kuoppiin, jossa niiden annettiin kasvaa ja kiinnittyä toiset 24 tuntia. Solut pyrittiin kasvattamaan 50-90 % konfluenssiin ennen levyllä siirtoa. Solut laskettiin ennen transfektiota ja ennen siirtoa koelevylle. Soluja siirrettiin aina laskennallisesti identtiset määrät. Jokaiseen kuoppaan siirrettiin 80 µl solususpensiota, jossa haluttu määrä (5 000, 10 000, 20 000 Tai 40 000) soluja, jonka jälkeen solut kasvatettiin inkubaattorissa 24 tuntia 35 celsiusasteessa ilman CO₂. Mittauskasetti asetettiin yön yli apulevylle niin, että mittauskasetin sensorit tulivat valmistajan levyspesifisen kalibrantin pinnan alle. Kalibranttia laitettiin jokaiseen kaivoon 200 µl. Levyt, medium ja kalibrantti olivat kaikki Agilent technologies -yhtiön Seahorse tuotteita.

Mittauspäivänä mikrolevylle lisätyt solut pestiin varovasti mittauksissa käytettävällä mediumilla, jonka jälkeen solujen kiinnittyminen tarkastettiin mikroskoopilla. Kaivoihin jätettiin aina 20 µl mediumia pesujen välissä. Kaivoihin lisättiin ennen mittauksia mediumia lopputilavuuteen 200 µl. Kaikki soluille lisätyt inhibiittorit lisättiin edellä mainittuun mediumiin laimennettuina. Mitonkondriaalisen energiantuoton inhibointiin käytettiin valmistajan ATP-kitin inhibiittoreita, oligomysiiniä ja rotenoni/antimysiini A-seosta. Inhibiittoreita lisättiin niin, että oligomysiinin loppukonsentraatio mittausvaiheessa oli 1,5 µM ja rotenoni/antimysiini A -seoksen 0,5 µM. Basigiini-inhibitiota varten lisättiin pCMBS (p-chloromercuricphenylsulfonic acid) -inhibiittoria loppukonsentraatioon 0,1 mM tai 0,2 mM.

Embigiinihiljennyskokeissa (hiljennyskoe 1) mittaus kesti noin tunnin. Soluja mitattiin ensi 14,5 minuuttia ilman inhibiittoreita, jonka jälkeen kaikille soluille lisättiin oligomysiini-inhibiittoria. Tämän jälkeen mittauksia jatkettiin jälleen, kunnes 43 minuutin jälkeen lisättiin rotenoni/antimysiini A -seos. Mittausta jatkettiin 53,5 minuuttiin asti, jolloin tehtiin viimeinen mittaus. Laite mittasi mediumin happamoitumisnopeuden noin 6,5 minuutin välein, kolme kertaa ennen inhibiittoria sekä molemman inhibiittorin lisäyksen jälkeen.

Basigiini-inhibitiokokeissa (hiljennyskoe 2) mittaus kesti noin 180 minuuttia. Hiljentämättömiä sekä embigiinihiljennettyjä soluja mitattiin 30 min, jonka jälkeen lisättiin kaikille soluilla pCMBS. Mittausta jatkettiin, kunnes 130 minuutin kohdalla soluille lisättiin oligomysiini sekä 160 minuutin kohdalla rotenoni/antimysiini A -seos.

Kaikissa ajoissa jokaisesta näyte/inhibiittori-yhdistelmästä ajettiin neljä rinnakkaisnäytettä.

3.8 Tilastollinen analyysi

Tutkimuksessa tehdyn embigiinihiljennyskokeen, jossa embigiinihiljennettyjä sekä hiljentämättömiä keratinosyyttisoluja vertailtiin toisiinsa, merkitsevyyttä tarkasteltiin tilastollisilla menetelmillä. Tätä varten yhdistettiin embigiinihiljennyskokeiden neljän toiston tulokset. Koska jokaisella näytteellä ajettiin kokeissa neljä rinnakkaisnäytettä, jokaiselle näytteelle saatiin yhteensä 16 arvoa jokaisessa mittauspisteessä. Yhdistetystä datasta laskettiin jokaiselle mittauspisteelle tilastollinen merkitsevyys niin, että tutkittiin Emb1 ja Emb4-näytteiden eroa kontrollinäytteeseen verrattuna. (16 siRNA-arvoa verrattiin 16 kontrolliarvoon.) Koska data ei noudata selkeää normaalijakaumaa käytettiin analyysiin Mann-Whitneyn järjestyssumma U-testiä, joka ei vaadi mitään datan ominaisuuksia. Tämän takia kyseisellä testillä on myös verrattain vaikea saavuttaa tilastollinen merkittävyys verrattuna moniin muihin tilastollisiin testeihin. Emb1 ja Emb4 -näytteiden jokaiselle mittauspisteelle määritettiin testillä P-arvo, jossa alle 0.05 -arvoa pidettiin tilastollisesti merkitseväenä.

4 Tulokset

4.1 Tietokannat sisältävät rajoitetusti tietoa embigiinin ilmenemisestä

Tutkimuksen tavoitteena oli ennen kaikkea tuottaa lisätietoa embigiinin toiminnasta. Embigiinin ja sen kanssa samankaltaisen proteiinin basigiinin tiedettiin toimivan kaperoniproteiineina solukalvon läpi monokarboksylaatteja kuljettaville MCT-proteiineille. Tutkimuksessa keskityttiinkin tähän, tarkoituksena selvittää embigiinin sekä basigiinin toiminnan muokkauksen vaikutusta koko solun energia-aineenvaihduntaan. (Halestrap ja Price 1999 (katsausartikkeli); Pierre ja Pellerin 2005 (katsausartikkeli); Klier ja muut 2011; Mannowetz ja muut 2012; Halestrap 2012 (katsausartikkeli); Halestrap 2013 (katsausartikkeli); Muramatsu 2016 (katsausartikkeli); Perez-Escuredo ja muut 2016 (katsausartikkeli)).

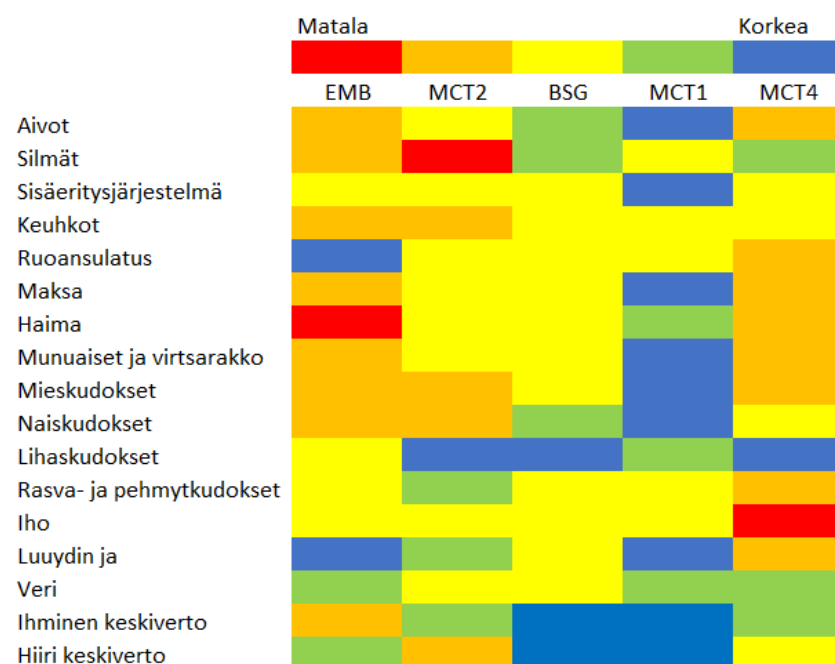
Ennen kokeiden aloittamista embigiinistä ja muista oleellisista proteiineista kuten basigiinista ja MCT-proteiineista kerättiin jo olemassa olevaa data erilaisista tietokannoista. Yleisesti embigiinistä löytyi hyvin RNA-dataa, eli tietoa geenien ilmenemisestä. Proteiinitasolla embigiinin olemassa oleva data oli rajoitetumpaa, kun taas basigiinista dataa oli paremmin. Saatua dataa sovellettiin sopivan solumallin etsimiseen sekä kokeiden suunnitteluun.

4.1.1 Embigiiniä esiintyy monissa aikuisen ihmisen kudoksissa ja soluissa

The Human Protein Atlas -tietokanta sisältää nimensä mukaisesti tietoa ihmisen proteomista. Tietokannassa on proteiinien lisäksi RNA dataa yleisestä kudosis- ja solutason esiintyvyydestä sekä ilmenemistason muutoksista tautitiloissa. Embigiini ilmenee tietokannan mukaan RNA-tasolla monissa kudoksissa, mutta voimakkaimmin aikuisen ihmisen maha-suolikanavassa sekä luuytimessä. Tietokanta näyttää (kuva 7) embigiinin esiintyvän RNA-tasolla jossain määrin miesspesifisissä kudoksissa, ihossa, keuhkoissa sekä munuaisissa, joissa oma tutkimusryhmämme on osoittanut embigiinin ilmentymisen hiireissä myös proteiinitasolla western-blotilla. Solutasolla tietokantaa näyttää vahvan embigiinin ilmenemisen etenkin veri- ja immuunijärjestelmän soluissa, epiteelisoluissa sekä joissain neuroneissa. Näistä etenkin T-soluissa (immuunisolu) ja

tappisoluissa (silmän neuronisolu) embigiinin ilmeneminen on vahvaa. Keratinosyyteissä on kohtalainen embigiinin ilmeneminen. Basigiinista dataa on sekä RNA- että proteiinitasolla. Sitä esiintyy hyvin voimakkaasti lihaskudoksissa sekä melko vahvasti aivoissa, mikä korostaa sen ja siihen liittyvien MCT(1 ja 4) -proteiinien tärkeyttä energia-aineenvaihdunnassa. Myös Genevestigator-työkalun mukaan (Hruz ja muut 2008) Basigiini esiintyy yleisesti embigiiniä voimakkaammin (kuva 7), etenkin ihmisessä. MCT2-ilmeneminen on keskiarvoisesti ihmisessä usein vahvempaa kuin embigiinin ilmeneminen. (The human protein atlas, Uhlén ja muut 2015; Thul ja muut 2017).

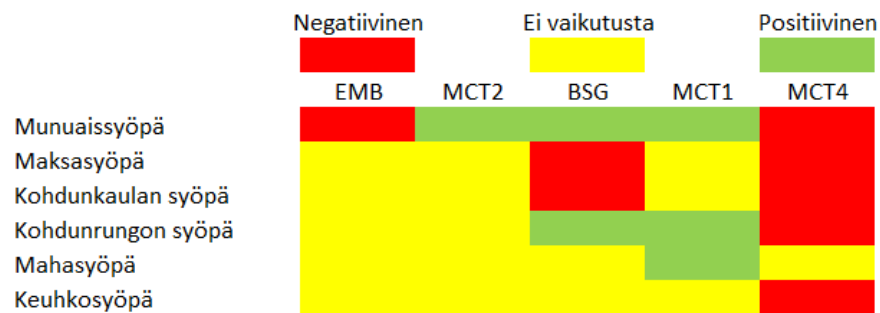
Vaikka embigiini, basigiini sekä niiden yhteydessä esiintyvät proteiinit vaikuttavat toimivan ja ilmenevän eri eläinlajeissa samantapaisesti, on eri eläinten välillä kuitenkin eroja. Tyypillisessä koe-eläinmallissa hiiressä, embigiini ilmenee yleisesti vahvemmin kuin ihmisessä (kuva 7). Tämä osaltaan monimutkaistaa jo perustavanlaatuisesti vaikeampaa embigiinin havainnointia ja tutkimusta ihmisessä. Eroavuudet voivat myös kyseenalaistaa hiirimallin vertailtavuuden ihmiseen. Vaikka määrät eroavat, niiden suhteet pysyvät kuitenkin samankaltaisina. Sekä ihmisessä että hiiressä basigiinin ilmeneminen on yleisesti suurempaa kuin embigiinin ja sen yhteydessä esiintyvän MCT2:n ilmentymiset. Eroavuudet on kuitenkin otettava huomioon, kuten eläinmalleja käytettäessä yleensä.



Kuva 7. Embigiinin, basigiinin sekä MCT1,2 ja 4 -proteiinien ilmeneminen eri kudoksissa. Määrät ovat suuntaa antavia. Lähteet: Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>), Genevestigator (Hruz ja muut 2008).

4.1.2 Embigiini vaikuttaa moniin tauteihin

Kirjallisuudessa on viitteitä, että embigiinin ja basigiinin (sekä niiden yhteydessä esiintyvät MCT-proteiinit) vaikuttavat tautien syntyyn ja kehitykseen, syövän ollessa yleinen esimerkki. (Guenette ja muut 1997; Pertega-Gomes ja muut 2015; Jung ja muut 2016; Ruma ja muut 2018). Human Protein Atlaksen patologiaosion datan mukaan sekä embigiini että sen yhteydessä tyypillisesti esiintyvä MCT2 ovat molemmat munuaissyövän merkkiaineita (kuva 8). (Uhlen ja muut 2017). Erityisen mielenkiintoista on näennäinen paradoksi: kyseisessä syövässä korkea embigiinin määrä on huonon ennusteen merkkiaine, kun taas korkeampi MCT2 -määrä on positiivinen prognostinen merkkiaine. Vaikka datassa näkyy selkeä ja tilastollisesti merkittävä trendi, ei datan hajanaisuuden takia voida tehdä liian yleistäviä päätöksiä. On mahdollista, että oleellisinta on kyseisten proteiinien ilmenemisen muutos ”normaalitasosta”, eikä välttämättä absoluuttinen määrä.



Kuva 8. Embigiinin, basigiinin sekä MCT1,2 ja 4 -proteiinien korkean määrän merkitys tiettyjen tautitilojen prognooseihin. Positiivinen tarkoittaa proteiinin korkean ilmenemisen viittaavan hyvään prognoosiin, eli korkeampaan hengissä selviytymisen mahdollisuuteen ilmenemisen ollessa korkea. Negatiivinen puolestaan huonoon prognoosiin, eli matalampaan selviytymismahdollisuuteen ilmenemisen ollessa korkea. Lähteet: Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>).

4.2 Keratinosyytit ilmensivät haluttuja proteiineja

Kokeita varten tarkasteltiin kahta solulinjaa, hiiren NIH3T3 -soluja sekä hiiren IMBCA-keratinosyyttejä. NIH-solujen tarkastelussa käytettiin kolmea eri populaatiota: Muokkaamattomia NIH3T3 -soluja, soluja, jotka olivat tyhjällä vektorilla transfektoituja sekä embigiinin ilmenemistä lisäävän embigiini-yliexprессиогeenin sisältävällä vektorilla transfektoituja. Soluista tarkasteltiin niiden proteiinien ilmenemisprofiilien soveltuvuus kokeisiin qPCR-kokeilla. Erityisen tärkeää kokeiden kannalta olivat MCT1,2 ja 4 -proteiinit sekä embigiinin ja basigiinin läsnäolo.

Kaikkien solupopulaatioiden MCT1, MCT2, MCT4, EMB sekä β -aktiini -ilmenemiset mitattiin kvantitatiivisella PCR:llä. qPCR-ajossa oli yhteensä 40 sykliä. (Taulukko 3.) Kokeiden perusteella kaikki solutyypit ilmensivät sekä MCT1 että embigiini -proteiineja, embigiinin määrän ollessa 1-7% prosenttia näytteiden β -aktiinin määrästä. Näytteistä vain hiiren keratinosyytit ilmensivät MCT2:ta pienissä määrin. Koska kokeissa haluttiin testata embigiinin hiljennystä, oli sen läsnäolo välttämätön. Tästä syystä kokeita varten valittiin hiiren IMBCA-keratinosyytit. Emb-yliexprессиоvektorin sisältävän NIH3T3-solulinjan ei havaittu ilmentävän enempää embigiiniä kuin normaalit solut, minkä takia yliexprессиоvektorilla transfektoituja soluja ei käytetty. Keratinosyyteistä tarkastettiin kvantitatiivisella PCR:llä lisäksi basigiinin ja muiden MCT-proteiinien ilmeneminen (Taulukko 3). Solujen havaittiin ilmentävän runsaasti basigiinia, jonka määrä oli tutkituissa näytteissä kontrollina ja vertausgeeninä käytetyn β -aktiinin tasoista. MCT1 ja 2 -proteiinien määrä oli huomattavasti pienempiä, MCT2 ollessa erityisen pieni, vain murto-osia β -aktiinista (0.004 %). Lisäksi havaittiin myös monia muita MCT-proteiineja: Soluissa havaittiin kaikkia MCT5-14-proteiineja lukuun ottamatta MCT4, 6 ja 8.

Taulukko 3. Solujen geenien ilmeneminen qPCR:llä mitattuna. qPCR:ään ajettiin 40 sykliä. Taulukoissa geenien ilmenemisen määrät suhteessa β -aktiinin määrään. Tyhjät (punainen) ruudut ilmaisevat transkriptia, jota ei 40 monistussykliä kyetty havaitsemaan. Yllä (A) Kaikkien tutkittujen solujen MCT1,-2,-4, embigiinin sekä basigiinin ilmeneminen. Alla (B) MCT5-14-ilmentyminen hiiren keratinosyyteillä. Molemmat ajot tehtiin kahdesti kolmella rinnakkaisnäytteellä.

A

Solut	MCT1	MCT2	MCT4	EMB	BSG
Keratinosyytit	38 %	0,004 %	-	7,0 %	100 %
NIH3T3	16 %	-	-	1,5 %	100 %
NIH3T3/PCDNA	19 %	-	-	1,0 %	100 %
NIH3T3/EMB	13 %	-	-	1,7 %	100 %

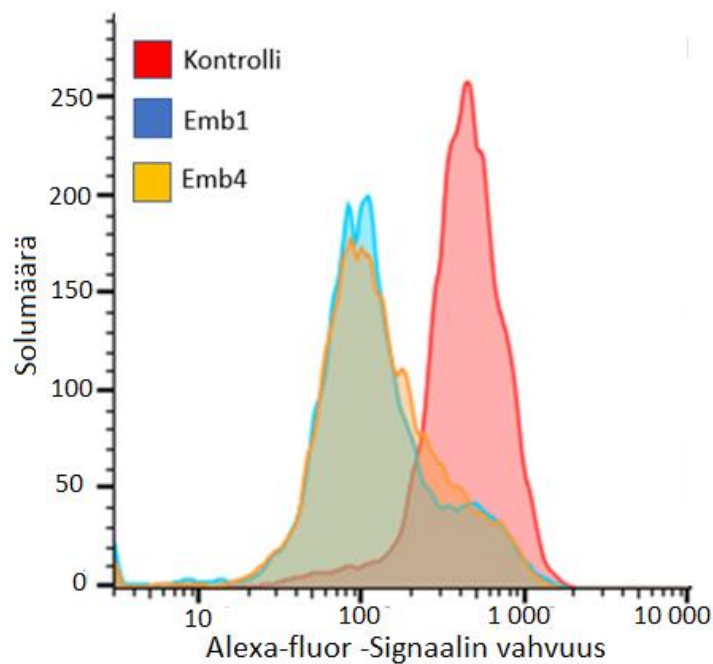
B

Geeni	MCT5	MCT6	MCT7	MCT8	MCT9
Vahvuus	0,04 %	-	0,01 %	-	0,01 %

Geeni	MCT10	MCT11	MCT12	MCT13	MCT14
Vahvuus	0,07 %	0,01 %	-	7,00 %	0,07 %

4.3 Embigiinin toimiva pintahiljennys todettiin virtausytometrialla

Kokeita varten tarvittiin keino häiritä embigiinin ilmentymistä. Embigiinin ilmeneminen hiljennettiin kahdella eri vasta-embigiini siRNA:lla Emb1 ja Emb4, kaksi valmistajan suunnittelemaa vasta-emb siRNA:ta. Solut transfektoitiin, jonka jälkeen niiden annettiin kasvaa kaksi päivää ennen mittauksia. Eläville soluille tehtiin pinta-embigiini -värjäys käyttämällä vasta-embigiini vasta-ainetta, joka leimattiin fluoresoivalla sekundäärivasta-aineella. Leimatut solut ajettiin virtausytometrilla embigiinin pintailmentymisen havainnoimiseksi (kuva 9). Emb-siRNA-hiljennyksen havaittiin vähentävän embigiinin määrää solujen pinnalla verrattuna kontrolliin: Emb1 siRNA tuotti vahvimman laskun. Lisäksi elävien ja ehjien solujen pinnoilla esiintyvän embigiinin värjäys ja sen hiljennyksen seurauksena pienempi määrä tuottivat lisätodisteita siitä, että embigiini esiintyy solukalvon pinnalla havaittavasti, jonka lisäksi hiljennys vaikuttaa embigiinin ilmenemiseen myös solukalvolla.

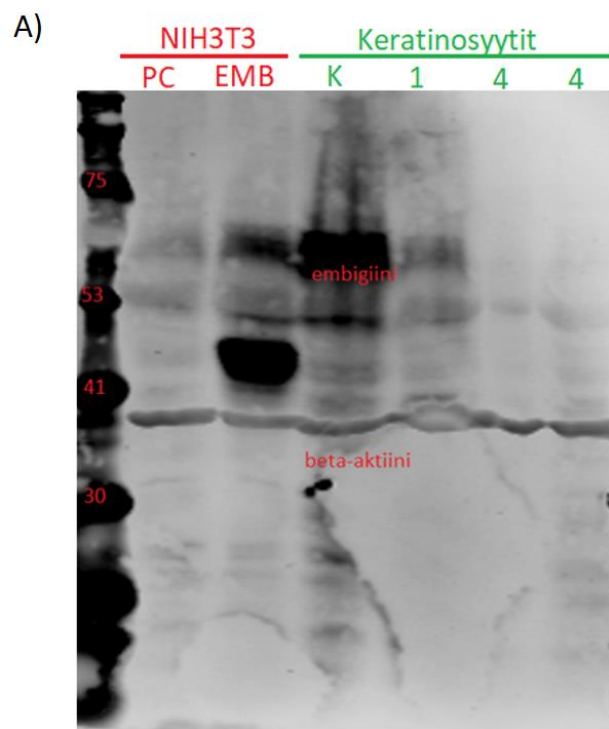


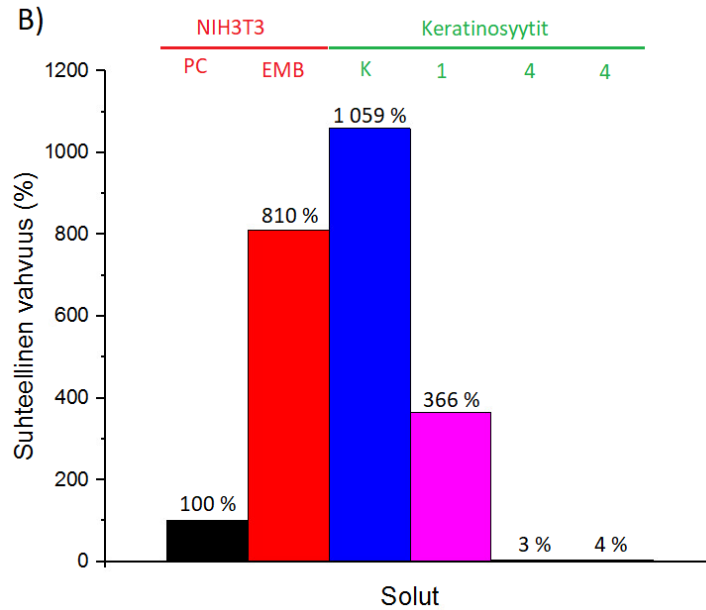
Kuva 9. Embigiinin hiljennyksen vaikutus pintailmentymiseen. Hiiren keratinosyyttisolut hiljennettiin vasta-emb1 tai 4 siRNA:lla (Qiagen Flexitube siRNA). Soluja kasvatettiin solukasvatusmaljoilla normaaleissa keratinosyyttien kasvatusolosuhteissa 48 h ennen mittausta. Mittaus suoritettiin sytometrisesti fluoresenssin aktivoimaa solujen jaottelua käyttäen.

4.4 Solujen embigiinin määrää tarkasteltiin western blotilla

Hiljennyksen toimivuutta tarkasteltiin myös Western blot -menetelmällä. Hiljennettyjen solujen annettiin kasvaa kaksi päivää, jonka jälkeen ne lysoitiin ja eroteltiin SDS-PAGE -geelillä. Erotellut proteiinit siirrostettiin membraanille, jossa ne leimattiin samoilla primaarivasta-aineilla kuin sytometriassa, sekä mittaukselle spesifisillä Odyssey fluor sekundäärivasta-aineilla (kuva 10). Hiljentämättömien keratinosyyttien voidaan havaita ilmentävän embigiiniä hyvin, vasta-emb siRNA1 ja 4 -hiljennettyjen keratinosyyttien ilmentäessä embigiiniä huomattavasti vähemmän. tyhjällä PCDNA -vektorilla transfektoitu NIH3T3 -solulinja ilmentää embigiiniä Western blotin perusteella heikosti. EMB-yliekspressiovektorilla transfektoitu solulinja puolestaan ilmentää embigiiniä vahvasti, mutta se on poikkeuksellisesti jakautunut kahteen erikokoiseen populaatioon. Western blot kvantitoitiin imageJ -ohjelmalla ja Embigiinileimojen vahvuudet normalisoitiin käyttäen latauskontrolleina käytettyä β -aktiinia. Tyhjällä vektorilla transfektoituja NIH3T3 -soluja käytettiin vertauskohtana (100 %). Embigiinileimojen

vahvuudet normalisoitiin käyttäen latauskontrolleina käytettyä β -aktiinia. NIH3T3 populaatioon verrattuna EMB -ylikspressiovektorilla transfektoidut NIH3T3 -solut ilmensivät embigiiniä huomattavasti enemmän, 810 % %, kun lasketaan sen eli 53 kDa -ilmeneminen. Tämä viittaa suurempaan proteiinimäärään, kuin mitä qPCR -mittaukset viittaisivat. 53-41 kDa -välillä on kuitenkin vielä lisäksi iso proteiinileima, joka eroaa muista näytteistä; tätä populaatiota ei otettu määrittäksessä huomioon. Scramble -transfektoidujen keratinosyyttien embigiinin määrä on puolestaan 1 059 %. emb 2 siRNA -näytteen vahvuus on 366 %, emb 4 siRNA -solujen ollessa vain 3 % ja 4 %, viitaten emb 4 siRNA:n vahvempaan inhibitioon, mikä on ristiriidassa muiden tuloksien kanssa.





Kuva 10. NIH3T3 ja keratinosyyttisolujen hiljennyksen toimivuus testattiin Western blot -menetelmällä. A) Western blot. Vasemmassa laidassa molekyylikoko. Kaksi vasempaa näytekaivoa NIH3T3 -soluja. PC tyhjällä PCDNA-vektorilla transfektoitu solupopulaatio, EMB embigiiniylikspressiovektorilla transfektoitu populaatio. Keratinosyyttinäytteet oikealla, vihreän viivan alla. K allstar scramble siRNA-transfektioitu kontrolli, 1 vasta-emb siRNA1 embigiinihiljennetty populaatio, 4 vasta-emb siRNA 4 embigiinihiljennetty populaatio B) Western blot -leimojen kvantitoidut vahvuudet käyttäen β -aktiinia latauskontrollina. NIH3T3-PCDNA -soluja käytettiin vertauskohtana (100 %).

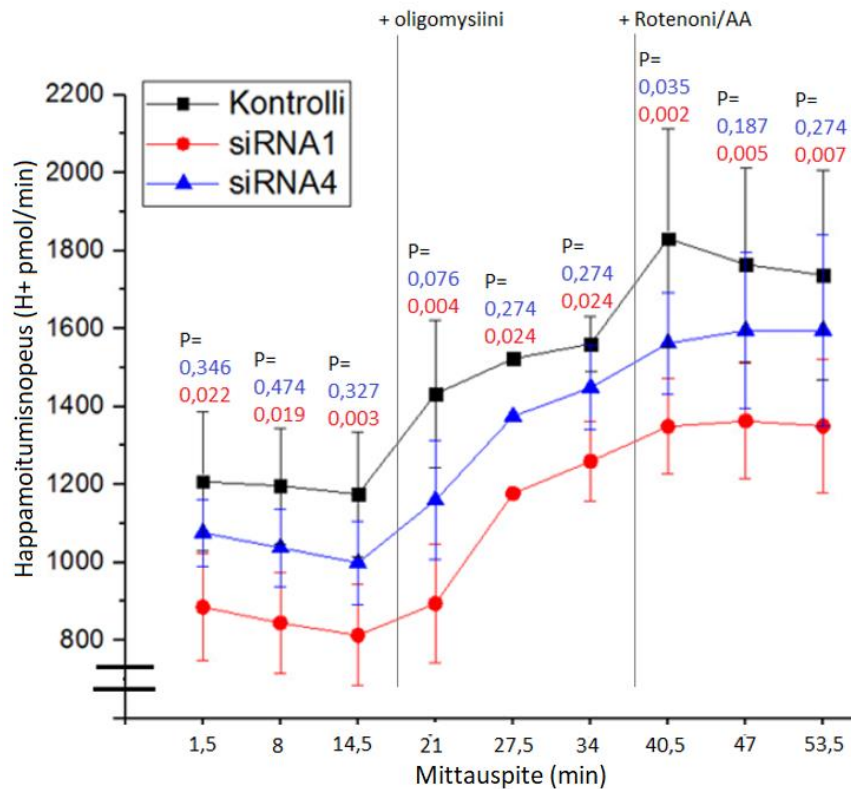
4.5 Embigiinin häiritseminen vaikutti mediumin happamoitumisnopeuteen

Hiljennyskokeissa testattiin embigiinin hiljennyksen vaikutusta hiiren keratinosyyttisoluihin. Lisäksi tutkittiin basigiinin inhibition vaikutusta. Mittaukset tehtiin Agilent Seahorse -laitteella, joka kykenee mittaamaan näytesolujen mediumin happamoitumisen ja hapenkulutuksen nopeutta. Soluista mitattiin aina kolme eri populaatiota. Kontrollisolut transfektoitiin ei-hiljentävällä kontrolli-siRNA:lla. Kahdelle muulle populaatiolle tehtiin RNA-interferenssi eli hiljennys (RNAi): Näytteet transfektoitiin embigiiniä hiljentävillä Emb1 tai Emb4 -siRNA:lla 48 h ennen mittauksia. Ennen transfektioita kaikille kasvatusmaljoille siirrettiin identtinen määrä hiiren keratinosyyttejä. 24 h kasvatuksen jälkeen solut siirrettiin Agilent Seahorse-maljoille.

Hiljennettyjen solujen huomioitiin kasvavan usein huonommin kuin kontrollisolujen ja etenkin Emb1-solut olivat tyypillisesti harvalukuisempia kuin muut populaatiot.

Ensimmäisessä hiljennyskokeessa mitattiin vain kontrolli, Emb1 ja Emb4 -soluja valmistajan ATP-testikittiä käyttäen (hiljennyskoe 1). Kitti sisältää kahta erilaista inhibiittoria (oligomysiini sekä rotenoni/antimysiini A-seos), jotka estävät happea käyttävän ATP:n tuoton mitokondrioissa. Inhibiittoreilla on toisiaan täydentävä vaikutus, jotka yhdessä varmistavat happea käyttävän, mitokondriollisen energiantuoton estymisen. Inhibiittorien tarkoitus on Aerobisen ATP-tuoton estämällä lisätä glykolyysiä, joka lisää happamien sivutuotteiden tuottoa ja poistoa soluista. Koska embigiinin tiedetään olevan tärkeä kaperoni MCT2-proteiineille (Wilson ja muut 2005; Klier ja muut 2011; Halestrap 2013 (katsausartikkeli)), haluttiin testata, vähentääkö embigiinin hiljennys solujen mediumin happamoitumista. Tuloksien mukaan Emb1 ja Emb4 populaatioiden keratinosyyttisolut happamoittavat keskimäärin mediumia vähemmän kuin kontrollisolut, suurimman eron ollessa Emb1-populaatioiden solut (kuva 11). Molempien populaatioiden erot olivat käytännössä merkitseviä ja emb1 - hiljennetty populaatio myös tilastollisesti merkitsevä. Tilastollinen merkitsevyys laskettiin jokaiselle mittauspisteelle niin, että Emb1 ja Emb4 -populaatioiden yhteenlaskettua dataa (yhteensä 16 näytekaivoa per näyte, 4 rinnakkaisnäytettä jokaisessa neljässä toistossa). siRNA1-hiljennettyjä soluja ja allstar-transfektoituja kontrollisoluja verrattaessa kaikkien mittauspisteiden P-arvot olivat alle 0,05, arvojen ollessa välillä 0,002-0,024. siRNA4-hiljennettyjä ja kontrollisoluja verrattaessa tilastollista merkitsevyyttä ei kuitenkaan saavutettu, P-arvon ollessa yli 0,05 lähes kaikissa pisteissä. Erojen voidaan kuitenkin sanoa olevan käytännössä merkittäviä.

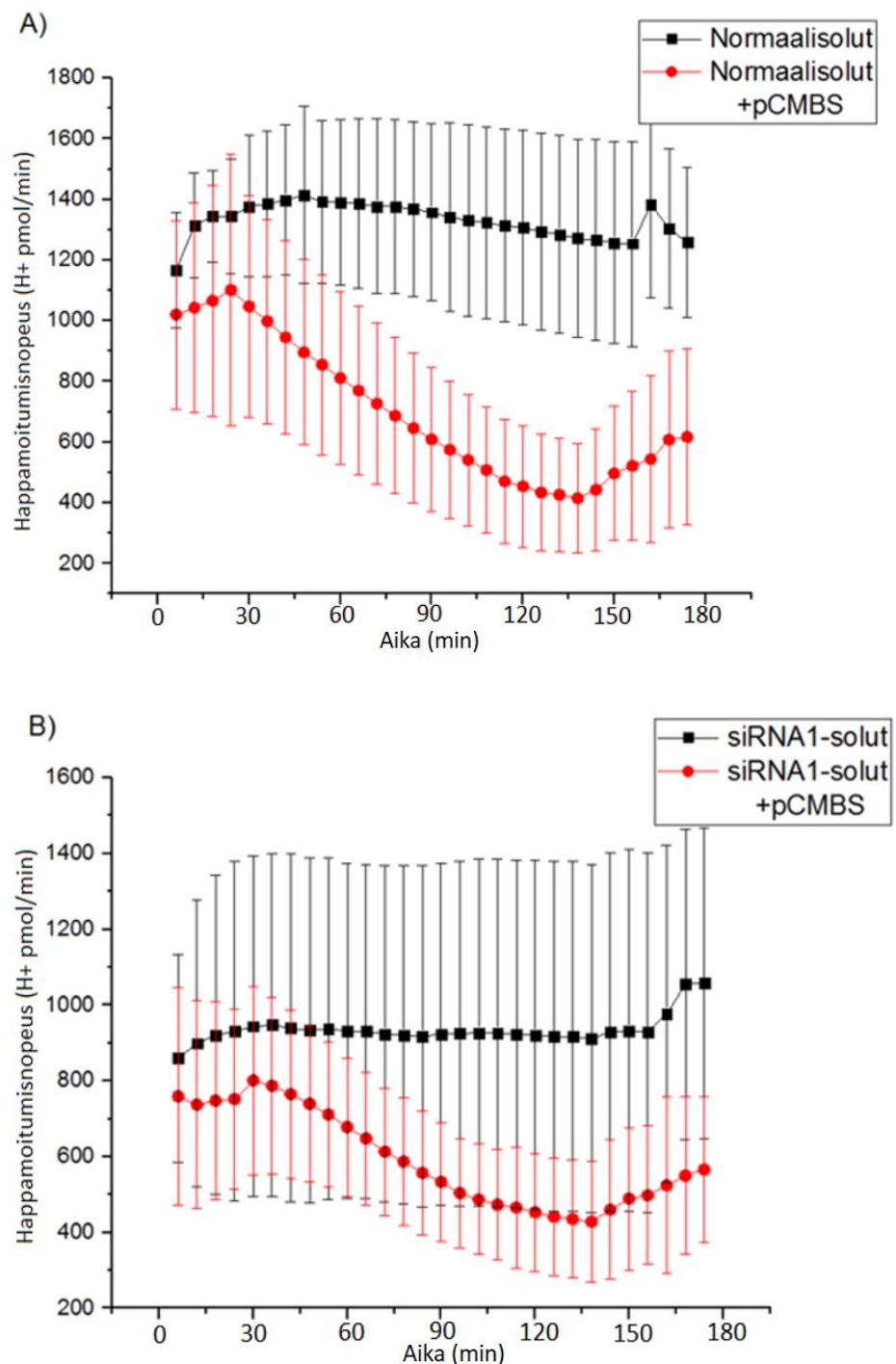
Pelkän inhiboinnin lisäksi testattiin Oligomysiini + rotenoni/AA -inhibition vaikutusta keratinosyytteihin, jotka kasvatettiin eri proteiineilla päällystetyissä kaivoissa. Soluja kasvatettiin laminiini, polylysiini, kollageeni I sekä fibronektiinipäällystetyissä kaivoissa. Tämän kokeen tulokset olivat kuitenkin hyvin epäselvät, eikä toistoista saatu yhteneviä tuloksia.

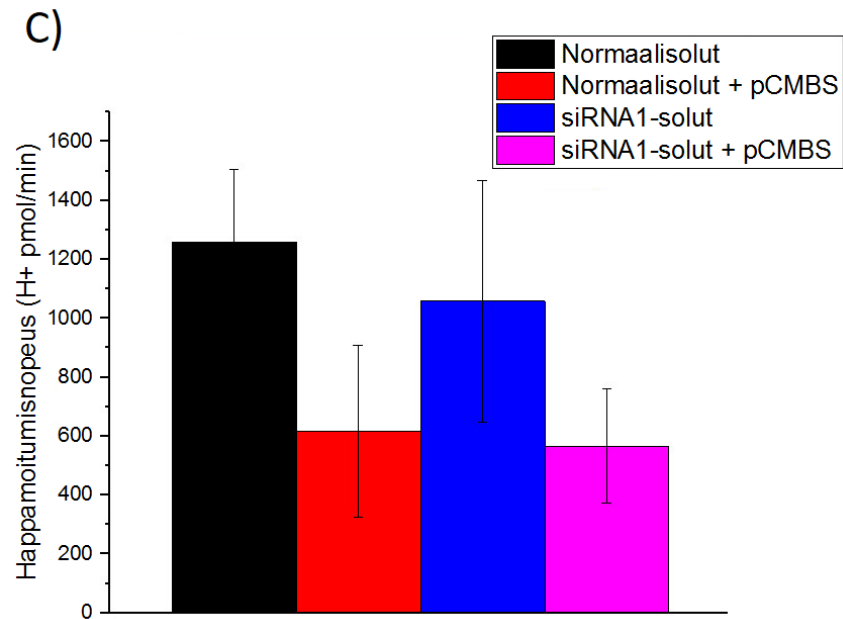


Kuva 11. Embigiinihiljennyksen vaikutus solujen mediumin happamoitumisnopeuteen (hiljennyskoe 1). Inhibiittorit lisättiin kolmannen mittauksen (14,5 min) jälkeen (oligomysiini) ja kuudennen mittauksen (34 min) (rotenoni/AA-seos) jälkeen. Laite laski mediumin happamuuden jokaisessa aikapisteessä. Aikapisteet ovat n. 6,5 minuuttia toisistaan. Kuvassa yksittäiset pisteet kuvaavat tietyn solutyypin yhden mittauspisteen kaiken datan keskiarvoa ja pystyviivat keskihajontaa. Lisäksi pisteiden päällä tilastollisen vertailun P-arvot. Sinisellä kontrollisolujen happamoitumisnopeus verrattuna siRNA 4 hiljennettyihin soluihin. Punaisella kontrollisolut verrattuna siRNA 1 soluihin. Pienempi arvo viittaa pisteiden arvojen suurempaan tilastolliseen merkittävyyteen. Tilastollisen merkitsevyyden raja on 0,05. P-arvo laskettu erikseen jokaiselle mittauspisteelle Mann-Whitneyn U-testillä. Jokaisessa mittauspisteessä neljän eri kokeen tulokset, joissa jokaisessa neljä rinnakkaisnäytettä, eli yhteensä 16 arvoa.

Näiden kahden kokeen lisäksi tehtiin jatkotutkimuksia basigiinille spesifisellä pCMBS-inhibiittorilla, mikä estää sen esiintymisen solun kalvolla (hiljennyskoe 2). Koska basigiini on tärkeä kaperoni MCT1-proteiineille sekä jossain määrin myös MCT2-proteiineille, sen inhibition voidaan olettaa vaikuttavan solujen aineenvaihduntaan etenkin happamien aineenvaihduntatuotteiden osalta. Tämän määrittämiseksi allstar scramble siRNA-transfektoiduille keratinosyyteille sekä siRNA1 ja siRNA4-soluille tehtiin koe, jossa osalla soluista lisättiin pCMBS-inhibiittoria, ja osalle ei. Tuloksissa käy ilmi (kuva 12), että

inhibitio todella laskee mediumin happamoitumisnopeutta. Aikaisempien kokeiden mukaisesti embigiinihiljennettyjen solujen mediumin happamoittamiskyky on alhaisempi kuin hiljentämättömien. Basigiinin inhibitiolla on kuitenkin hyvin samankaltainen, vahva mediumin happamoitumisnopeutta vähentävä vaikutus molemmissa solutyypeissä; embigiinihiljennettyjen solujen happamoitumisnopeus vaikuttaa olevan hieman pienempi kuin hiljentämättömien, mutta basigiinihiljennyksellä on huomattavasti suurempi vaikutus (kuva 12 C).





Kuva 12. Normaalien keratinosyyttien sekä siRNA1-hiljennettyjen solujen pCMBS-inhibitio (hiljennyskoe 2). pCMBS lisätään kokeen alussa noin 30 minuutin kohdalla. Kaikkiin soluihin lisättiin myös oligomysiini ja rotenoni/AA-inhibiittorit noin 130 ja 160 minuutin kohdalla. A) normaalit keratinosyytit ilman pCMBS-käsittelyä ja sen kanssa. B) siRNA1-hiljennetyt keratinosyytit ilman pCMBS-käsittelyä ja sen kanssa. Suuresta hajonnasta huolimatta, pCMBS-käsittelyn voidaan havaita vaikuttavan solujen aineenvaihduntaan. c) Hiljentämättömien ja hiljennettyjen solujen viimeisten mittauspisteiden solumediumin happamoitumisnopeudet ilman käsittelyä sekä pCMBS -käsittelyn kera. Pylväissä kuvattu kahdessa kokeessa saatujen arvojen keskiarvot, yhteensä 8 rinnakkaisnäytettä. Keskihajonta merkitty pystyviivoin.

5 Tulosten tarkastelu

Embigiini, jota kutsuttiin aikaisemmin yleisesti nimellä GP-70, havaittiin ensimmäisenä teratokarsinooman yhteydessä (Ozawa ja muut 1988). Pian selvitettiin, että se on kalvon läpäisevä, yhdeksän glykosylaatiolle sopivaa asparagiinitähdettä sisältävä, immunoglobuliinisuperperheeseen kuuluva glykoproteiini. Sen runsas ilmeneminen embryonaalisen karsinooman soluissa, eli aikaisen alkion erikoistumattomien solujen kaltaisissa soluissa, antoi viitteitä sen tärkeästä roolista yksilönkehityksessä.

Embigiinin toiminnasta ja sen esiintyvyydestä saatiin lisää tietoa nopeasti. Sen havaittiin esiintyvän hiirellä monissa aikuisenkin kudoksissa, vaikkakin pienemmissä määrin. Se oli kuitenkin ilmeisintä aikaisen yksilönkehityksen aikoihin. Aikuishiirenkin elimissä se esiintyi runsaimpana juuri tiinenä olevan naarashiiren munasarjoissa ja kohdussa, jälleen viitaten sen rooliin yksilönkehityksessä. (Ruo-Pan ja muut 1990).

Embigiinin toimintaa ei tunneta vielä täydellisesti. Tänä päivänä sen tiedetään kuitenkin esiintyvän paljon laajemmin sekä hiiressä että ihmisessä. Embigiini esiintyy kudostasolla, muun muassa molempien sukupuolien lisääntymiselimissä, aivoissa, erityskudoksissa, luuytimessä, ihossa sekä veressä. (Chao ja muut 2015; Silberstein ja muut 2016; Jung ja muut 2016; Ruma ja muut 2018). Tieto sen muista kuin yksilönkehitykseen liittyvistä rooleista on myös kasvanut. Sen tiedetään muiden basigiini-superperheen glykoproteiinien, kuten basigiinin, tapaan olevan tärkeä myös muissa tehtävissä, mukaan lukien aikuisissa yksilöissä. Näiden proteiinien tiedetään nyt toimivan sekä adheesioproteiineina että kaperoniproteiineina aineenvaihdunnan proteiineille, etenkin MCT-proteiineille. Embigiinin tiedetään esiintyvän etenkin MCT2-proteiinin yhteydessä. Vastaavasti Basigiini esiintyy etenkin MCT1 ja 4 yhteydessä. (Kirk ja muut 2000; Wilson ja muut 2005; Mannowetz ja muut 2012).

5.1 Embigiiniä esiintyy monissa kudoksissa kuten ihossa ja sen keratinosyyttisoluissa

Koska kirjallisuuden, tietokantojen sekä oman ryhmämme aikaisempien tutkimusten perusteella tiedämme embigiinin esiintyvän ihossa sekä kantasolujen yhteydessä,

valikoituivat ihon keratiinia tuottavat keratinosyyttisolut yhdeksi vaihtoehdoksi tutkimuksia varten, aiemmin käytettyjen NIH3T3 -solujen lisäksi. The human protein atlas -tietokanta (<http://www.proteinatlas.org>, Uhlén ja muut 2015; Thul ja muut 2017) tuki embigiinin esiintymistä näissä soluissa. Tehdyissä kokeissa solujen mRNA-ilmenemisprofiili testattiin qPCR-mittauksilla.

Soluille tehdyissä qPCR-mittauksissa selvitettiin kokeiden kannalta oleellisten proteiinien ilmenemiset. Usean qPCR-ajon tuloksien pohjalta voidaan pitää melko varmana, että hiiren keratinosyytit olivat basigiinia, embigiiniä sekä MCT1 ja MCT2-proteiineja sisältäviä, mikä oli datakantojen perusteella odotettavissa. MCT2-proteiinin ilmenemisen määrä oli kuitenkin muihin proteiineihin verrattuna hyvin pieni, vain 0,004 % β -aktiinin määrästä. Enemmän sitä ilmentävät solut olisivat luultavasti olleet parempia kokeisiin. MCT2-pitoisuudet ovat kuitenkin yleisesti pienehköjä, joten on vaikea kokeilematta arvioida ilmentävätkö muutkaan solutyypit MCT2:ta huomattavasti suuremmissa määrin. Monissa artikkeleissa (Halestrap 1999 (katsausartikkeli), Perez-Escuredo 2016 (katsausartikkeli)) mainitaan yleisesti MCT2 -proteiinin olevan harvinaisempi kuin MCT1, mutta tarkkoja määriä ei juurikaan ilmoiteta. NIH3T3 -soluissa MCT2 -ilmenemistä ei puolestaan havaittu lainkaan, mikä poissulki nämä solut tutkimuksesta. Basigiinin sekä embigiinin määrät olivat kuitenkin kokeiden tarpeisiin hyvin riittävät, kyseisten solujen ilmentäen basigiinia hyvin runsaasti, samankaltaisissa pitoisuuksissa kuin β -aktiinia. Embigiinin määrä, 7 % keratinosyyteissä ja 1,0-1,7 % NIH3T3-soluissa, oli basigiinin määrää pienempi, mikä oli myös odotettavissa. Keratinosyyttien embigiinin ilmeneminen oli myös NIH3T3 -soluja vahvempi. Keratinosyyttien laajempi MCT-proteiinien ilmeneminen tarkastettiin vielä erillisellä qPCR-mittauksella, jossa Keratinosyyttien MCT-profiilin havaittiin olevan laaja, niiden ilmentäen MCT1 ja -2 lisäksi myös MCT5,7 sekä 9-14 -proteiineja. MCT-proteiineilla Tehdyt hiljennyskokeet antoivat qPCR:n lisäksi varmistusta siitä, että sekä embigiinillä että basigiinilla on soluissa oleellinen tehtävä. Tehtyjen mittausten pohjalta keratinosyyttisolut voitiin todeta embigiini-MCT -kokeita varten soveltuviksi.

5.2 Western blot -menetelmällä voidaan osoittaa hiljennys

Ennen Keratinosyyttisolujen tarkastelua kokeiltiin myös NIH3T3 -soluja, joihin oli lisätty aktiivinen embigiiniä koodaava geeni, jolla embigiinin määrää saataisiin nostettua suhteessa muokkaamattomiin soluihin. qPCR -mittauksissa transfektoitujen solujen embigiinin ilmeneminen ei kuitenkaan selvästi eronnut soluista, joihin transfektoitiin vain tyhjä vektori. Western blot -tarkastelussa embigiinivektorilla havaittiin kuitenkin embigiinin määrää nostava vaikutus, mutta embigiinin havaittiin lisäksi jakautuvan kahteen erisuureen populaatioon, viitaten jonkinlaiseen mahdolliseen häiriöön tai virheeseen embigiinin tuotossa: Kooltaan pienempi populaatio on mahdollisesti puutteellisesti glykosyloitua embigiiniä, joka ei luultavasti esiinny solukalvolla. Keratinosyytit näyttivät myös western blot -tarkastelussa ilmentävän embigiiniä vahvemmin kuin normaalit NIH3T3 -solut, embigiinin määrän ollessa keratinosyyttisoluissa 1059 % verrattuna NIH3T3 -soluihin. Tämän lisäksi hiljennettyjen ja hiljentämättömien keratinosyyttisolujen välillä näkyi selkeä ero. NIH3T3 -solujen qPCR ja western -kokeiden tulokset molemmat viittaavat muokkaamattomien keratinosyyttien vahvempaan embigiinin ilmenemiseen kuin NIH3T3 -soluissa. Kuitenkin Western blot -määrityksen perusteella NIH3T3 -soluihin transfektoidulla embigiinin ilmenemistä lisäävällä vektorilla on solujen embigiinin määrään suurempi vaikutus, kuin mihin NIH3T3 -solujen qPCR -kokeet viittaisivat. Lisäksi western blot -tarkastelun perusteella vaikuttaa, että embigiiniä runsaammin ilmentävissä soluissa merkittävä osa embigiinistä on glykosyloimatonta, ja näin ollen tämänhetkisen tiedon mukaan epätoiminnallista. Nämä tiedot tekivät vahvasti embigiiniä luonnollisesti ilmentävästä ja luotettavasti hiljennettävistä keratinosyyteistä paremman valinnan tehtyihin tutkimuksiin. Western blotin mukaan käytetyistä siRNA:sta emb 4 olisi emb 1:tä vahvempi embigiinin hiljennyksessä emb 1:n laskiessa embigiinin ilmenemisen noin 35 % normaalista, emb 4:n vastaavasti laskiessa ilmenemisen alle prosenttiin normaalista. Nämä tulokset ovat kuitenkin ristiriitaisia monien muiden tuloksien kanssa.

Koska sekä qPCR -mittaukset, virtaussytometria sekä tehdyt hiljennyskokeet viittaavat emb 1 -siRNA:n olevan vahvempi inhibiittori kuin emb 4, kyseinen western blot saattaa olla epäluotettava. Tämä mittaus tulisi toistaa ja tarkastella uudelleen.

5.3 siRNA -hiljennys laski embigiinin määrää keratinosyyttisolujen pinnalla

Virtaussytometrimittausten perusteella voitiin havaita siRNA-hiljennyksen vaikuttavan halutusti embigiinin esiintymiseen keratinosyyttisolujen pinnalla. Kokeissa käytettyjen solujen annettiin kasvaa kaksi päivää ennen mittauksia: tämän takia on vaikea sanoa, laskeeko embigiinihiljennys embigiinin määrää jo transfektoitujen solujen pinnalla, vai laskeeko pintaembigiinin määrä vasta solujen jakauduttua. siRNA-hiljennys vaikuttaa suoraan vain mRNA:n määrään, eikä siis suoraan poista embigiiniä solukalvosta. Hiljennyksessä siRNA 1:n havaittiin olevan siRNA 4:ää tehokkaampi estämään embigiinin ilmenemistä. Myöhemmin tehdyt kokeet tukivat näitä havaintoja, siRNA 1-hiljennettyjen näytteiden tulosten eroten enemmän kontrollista kuin siRNA 4-hiljennettyjen.

Koska embigiini toimii adheesioproteiinina soluille sekä apuproteiinina MCT-proteiineille vain sen esiintyessä solukalvolla, on sen ilmeneminen juuri solujen pinnalla oleellisempaa kuin sen geenin luenta tai määrä solun sisällä. Ehjille soluille tehty virtaussytometria on arvokas ja toimiva menetelmä, joka antaa hyödyllistä tietoa embigiinin ilmenemisestä juuri siellä, missä se koeasetelmalle on oleellisinta. Vaikka qPCR ja western blot ovat myös käytännöllisiä menetelmiä solujen tarkasteluun, on virtaussytometria käytetyistä ilmenemisen mittauksen menetelmistä sopivin haluttuun tarkoitukseen.

5.4 Embigiinin ja basigiinin hiljennyksellä on mediumin happamoittamista laskeva vaikutus, luultavasti energia-aineenvaihdunnan häiritsemisen takia.

Sekä embigiini että basigiini vaikuttavat solujen aineenvaihduntaan, etenkin MCT-proteiinien välityksellä. MCT-proteiinien tiedetään esiintyvän niiden avustajaproteiineina toimivien basigiiniperheen proteiinien kanssa. MCT2:n tiedetään

esiintyvän ensisijaisesti embigiinin yhteydessä (Wilson ja muut 2005), MCT1 ja 4:n puolestaan esiintyen basigiinin yhteydessä. Ilman apuproteiinejaan, MCT-proteiinit eivät esiinny solujen kalvoilla, eivätkä näin kykene kuljettamaan ravinteita solukalvon läpi. (Poole ja Halestrap 1997; Halestrap 2013 (katsausartikkeli)). MCT-proteiinit kuljettavat happamia aineenvaihduntatuotteita, eritoten laktaattia, joita solut tuottavat etenkin hapettomissa olosuhteissa. MCT-proteiinit mahdollistavat laktaatin poiston soluista. Estämällä embigiinin ilmeneminen haluttiin tutkia sen vaikutusta solujen energia-aineenvaihduntaan, etenkin oloissa, joissa oksidatiivinen energiantuotto on estynyt.

Hiljennys- ja inhibitiokokeissa tarkasteltiin ensin embigiinihiljennettyjen solujen mediumin happamoittamisnopeutta verrattuna hiljentämättömiin soluihin, samalla inhiboiden solujen oksidatiivista energiantuottoa. Näissä olosuhteissa solut kykenevät tuottamaan energiaa vain hapettomasti, tuottaen suuria määriä laktaattia sivutuotteena (hiljennyskoe 1). Näin erot mediumin happamoitumisnopeudessa voidaan melko varmasti liittää juuri solujen aineenvaihduntaan ja niitten kykyyn poistaa laktaattia. Tämän jälkeen tutkittiin embigiinihiljennettyjen ja hiljentämättömien solujen mediumin happamoitumisnopeutta basigiini-inhibition yhteydessä (hiljennyskoe 2). Osoittamalla selkeä ero mediumin happamoitumisessa hiljennettyjen ja hiljentämättömien solujen välillä, Kokeissa pystyttiin melko luotettavasti osoittamaan, että embigiinin hiljennys sekä basigiinin häiritseminen *p*CMBS -inhibiittorilla vaikuttavat kohdesoluihin. Molemmissa tapauksissa hiljennettyjen solujen mediumin happamoitumisnopeus väheni. Koska MCT-proteiinien tiedetään olevan riippuvaisia basigiinista sekä embigiinistä, sekä kuljettavan happamia aineenvaihduntatuotteita, on kohtuullista olettaa, että embigiinin/basigiinin inhibitio vaikuttaa soluihin juuri perusmetabolialla estävästi. Aikaisemmin tehdyt kokeet ovat linjassa tuloksien kanssa. Ainakin yhden aikaisemmin tehdyn tutkimuksen tulokset ovat tehtyjen kokeiden kanssa samankaltaisia, havaiten kohonneen L-laktaattipitoisuuden solujen sisällä sekä laskeneen MCT2-määrän solujen kalvoilla (Jung ja muut 2016).

Tehdyssä basigiini-inhibitiokokeessa (hiljennyskoe 2) tulos oli lähinnä kvalitatiivinen. Basigiini-inhibition voidaan havaita laskevan mediumin happamoitumisnopeutta.

Vastaavasti inhiboimattomien näytteiden mediumien happamoitumisnopeudet pysyvät odotettavasti lähes vakioina. Basigiinihiljennyksenkin voidaan siis embigiinin tapaan olettaa vaikuttavan negatiivisesti solujen energia-aineenvaihduntaan. Basigiinin inhibiittorihiljennyksen yhteydessä basigiinin estymisen vaikutus olikin niin suuri, ettei embigiinin hiljennys aiheuttanut suurta vaikutusta. Tässä kokeessa hajonta saatujen arvojen välillä oli poikkeuksellisen suurta, etenkin soluissa, joissa myös embigiini oli hiljennetty (kuva 12 B). On mahdollista, että useampi solujen toimintaa samanaikaisesti häiritsevä tekijä lisää jo olevia vaihteluita solupopulaatioiden välillä. Paranneltu koeasetelman ja menetelmien optimointi auttaisi luultavasti hajonnan vähentämisessä.

Embigiini-hiljennyskokeista (hiljennyskoe 1) saatiin kvantitatiivisempi tulos. siRNA1 ja siRNA4 keratinosyyttisoluihin embigiinin määrän vähenemisen aiheuttama mediumin happamoittamisnopeus oli merkittävästi alempi kuin kontrollisolujen. Tämä siitä huolimatta, että embigiinin määrä soluissa oli huomattavasti basigiinia pienempi (7 % basigiinin määrästä). Lisäksi myös embigiinistä eniten riippuvainen MCT2 ilmenee soluissa paljon pienemmissä pitoisuuksissa kuin MCT1, johon embigiinin hiljennyksen ei pitäisi vaikuttaa, etenkin sen ensisijaisen avustajaproteiinin, basigiinin, ollessa läsnä (Wilson ja muut 2005; Mannowetz ja muut 2012).

Embigiinihiljennyskokeita tarkastellessa niiden neljän toiston datat yhdistettiin ja jokaisen siRNA1 ja siRNA4-mittauspisteen arvoja verrattiin kontrollisolujen mittauspisteisiin. siRNA4 ei tuottanut tilastollisessa tarkastelussa merkittävää eroa, mutta siRNA 1 tuotti selvästi tilastollisesti merkitsevän eron siRNA 1-hiljennettyjen solujen ja kontrollisolujen välillä jokaisessa mittauspisteessä, rajan ollessa $P < 0,05$. sytometriamittauksen mukaan siRNA 1 -hiljennys vähentää embigiinin ilmenemistä solujen pinnalla vahvemmin kuin siRNA 4. Embigiinihiljennyskokeiden Tilastollinen tarkastelu tehtiin käyttämällä Mann-whitneyn U-testiä (Wilcoxonin järjestyssummatesti). Koska U-testi ei vaadi mitään oletuksia arvojen jakaumista ja koska se ei helposti anna tilastollisesti merkitsevää tulosta verrattuna muihin tilastollisiin testeihin, siRNA1-populaatioiden tilastollisesti merkitsevää tulosta voidaan pitää luotettavana. siRNA1-populaatioissa mediumin happamoitumisnopeus oli huomattavasti pienempi kuin kontrollisolupopulaatioissa sekä siRNA4 -populaatioissa,

jonka ero kontrollista ei riittänyt tilastolliseen merkittävyyteen. siRNA1- hiljennetty populaatio reagoi soluhengitysinhibiittoreihin samankaltaisesti kuin kontrollipopulaatio, mutta muutos vaikuttaa olevan hiljennetyissä soluissa hitaampi kuin kontrollisoluissa. Ensimmäinen Oligomysiini + Rotenoni/AA -koe toistettiin neljä kertaa, neljällä kokeensisäisellä rinnakkaisnäytteellä jokaista näytettä kohti. Jokaisen kokeen tulokset olivat samankaltaisia, minkä lisäksi kaikkien kokeiden yhdistetty data antoi saman tuloksen kuin erilliset kokeet.

Kokeissa suurin luotettavuutta laskeva tekijä oli suurehko hajonta eri toistojen välillä, sekä vähemmässä määrin myös kokeensisäisten rinnakkaisnäytteiden välillä. Solujen lisäämisen jälkeen solujen mediumi vaihdetaan ja solut pestään useaan kertaan, mikä saattaa aiheuttaa solujen häiriintymisen ja irtaantumisen. Huolellisuudesta huolimatta täysin samanlaisten arvojen saaminen eri toistoissa osoittautui hyvin hankalaksi. Jonkinasteinen hajonta kokeiden välillä on hyväksyttävää, jonka osoittaa tilastollisesti merkitsevä ero siRNA 1 ja kontrollisolujen välillä (ks. yllä). Hajonnan lisääntyminen kuitenkin vaikeuttaa tilastollisen merkitsevyyden saavuttamista.

Tehdyissä soluväliainetutkimuksissa, joissa kokeissa käytetyt solut lisättiin levyille, jotka olivat päällystetty erinäisillä soluväliaineen proteiineilla, ei saatu selviä tuloksia soluväliaineen vaikutuksista mediumin happamoitumisnopeuteen. Koska embigiini ja muut basigiiniperheen proteiinit ovat soluadheesioproteiineja, on hyvin mahdollista, että niiden vuorovaikutuksilla soluväliaineen kanssa on vaikutuksia solujen toimintaan, mikä voisi näkyä niiden toiminnassa. Tämän takia soluväliaineen molekyylien mahdolliset vaikutukset embigiinin ja basigiinin toimintaan olisi hyödyllistä selvittää paremmin. Tulokset olivat vaihtelevia, eikä niistä voi vielä tehdä tarkempia johtopäätöksiä. Tarkempi koeasetelman optimointi ja kokeiden toistaminen voivat tuottaa parempia ja selvempiä tuloksia.

Soluväliaineen molekyylien lisäksi Kirjallisuudessa mainitaan joitain embigiinin toimintaan vaikuttavia vuorovaikutuksia, kuten sen ja S100A4-vuorovaikutus (Ruma ja muut 2018). Kuitenkaan tarkkaa tietoa näiden vuorovaikutuksien vaikutuksesta embigiinin ja MCT:n yhteistoimintaan ei juurikaan ole. Paremmin tunnettu

vuorovaikutus on anhydraasien kyky tehostaa MCT-proteiinien toimintaa. Vastaavasti basigiinin tiedetään sekä vuorovaikuttavan S100A9:n kanssa, että sisältävän lektiinien tunnistavan hiilihydraattiosan (Muramatsu 2016 (katsausartikkeli)).

5.5 Solumetabolian mittaus pH:n kautta on toimiva menetelmä koeasetelmalle

Seahorse-laite ja solumetabolian mittaus pH:n kautta toimivat haluttuun tarkoitukseen. Sillä saadaan mielekästä ja tutkimusaiheen kannalta oleellista tietoa. Menetelmän kanssa on kuitenkin oltava huolellinen ja vaiheiden on oltava tarpeeksi hyvin optimoituja. Solumäärät tulisi mitata mahdollisimman tarkasti, sekä niiden häiritsemistä tulisi välttää. Solumaljojen konfluenssien tulisi olla mahdollisimman samanlainen toistojen välillä. Menetelmän ehkä riskialttein, sekä eniten vaihtelua aiheuttava vaihe, onkin juuri solukasvatuslevyn kuoppien pesut ja mediumien vaihto juuri ennen koetta, jolloin solut helposti irtoavat tai huuhtoutuvat. Tästä aiheutuvaa virhettä voidaan välttää varovaisella ja huolellisella työskentelyllä, sekä antamalla solulevyn kuoppiin lisättyjen solujen kasvaa ja kiinnittyä tarpeeksi kauan. Kuitenkin vaikka solulevyn kaivoihin lisättäisiin laskennallisesti saman verran soluja joka toistolla, ei solujen laskeminen ja sen perusteella lisääminen ole täysin virheetöntä, johtaen vääjäämättä jonkinasteiseen vaihteluun. Tämän lisäksi solut saattavat kasvaa hieman eri tahtiin eri toistoissa, johtaen erisuuruisiin solupopulaatioihin eri kokeissa. Koska solujen on oltava kuopissaan valmistajan ohjeen mukaan vähintään 24 h, ei niiden tarkkaa määrää voida laskea tai säätää juuri ennen ajoa.

Kokeissa solujen annettiin kasvaa yhden täyden vuorokauden, joka on pienin suositeltu aika. Jatkossa aikaa voisi pidentää ja vastaavasti kuoppiin lisättävää solumäärää vähentää. Koska kuoppien pienehköä määrää mediumia ei tule vaihtaa solujen kasvaessa ja kiinnittyessä, ei solujen huomattavasti pidempi kasvuaika luultavasti ole myöskään hyödyllistä. Pidempi kasvuaika saattaa myös lisätä kaivojen välisiä eroja, jos pientä vaihtelua jo on, tai jos solupopulaatiot eivät kasva täysin samoilla nopeuksilla. Menetelmä on kuitenkin tämänkaltaisiin tutkimuksiin käyttökelpoinen, ja parempi optimointi voi johtaa paremman datan tuottamiseen menetelmällä.

5.6 Tutkimusten jatkaminen

Lisätutkimuksia voitaisiin tehdä esimerkiksi hiljentämällä myös basigiinin ilmentyminen ja vertaamalla basigiini- ja embigiinihiljennettyjä soluja toisiinsa. Vaikka basigiinin inhibitio *p*CMBS-inhibiittorilla saa aikaan samankaltaisen vaikutuksen, voisi silti olla mielekäästä tarkastella kahta populaatiota, jotka hiljennetään ja kasvatetaan samoihin aikoihin. Lisäksi voitaisiin tehdä tuplahiljennys -solupopulaatio, jossa sekä embigiini että basigiini ovat hiljennetty. Näitä populaatioita hiljentämättömiin vertaamalla voitaisiin saada lisädataa näiden proteiinien vaikutuksista solujen aineenvaihduntaan sekä niiden yleiseen elinkelpoisuuteen. Tuplahiljennys, jossa sekä basigiini että embigiini ovat hiljennettyinä, on oletettavasti soluille hyvin haitallinen. Vahvan inhibition voi saatujen tuloksien perusteella olettaa häiritsevän solujen kasvua huomattavasti verrattuna kontrolli- ja yksittäishiljennettyihin soluihin. Pelkästään solujen kasvua tarkkailemalla ja laskemalla voitaisiin saada mielekäästä tietoa, jota seahorse-laitteella voitaisiin lisätutkia. Koska käytetyissä soluissa embigiinin ja MCT2-proteiinien määrät olivat pieniä verrattuna basigiiniin ja MCT1-proteiineihin, voisi olla mielekäästä toistaa koe soluilla, jotka ilmentävät vain embigiiniä, eivätkä siis laisinkaan basigiinia. Basigiinin ilmentyvyys on kuitenkin yleisesti laajempaa, vaikeuttaen tällaisten solujen hankkimista.

Embigiinin ja basigiinin on aikaisemmin osoitettu vuorovaikuttavan monien soluväliaineen molekyylien kanssa. Kaivojen päällystys soluväliaineen proteiineilla ei kuitenkaan näennäisesti vaikuttanut soluihin. On mahdollista, ettei koeasetelmassa soluväliaineen lisäys vaikuta soluihin tavalla, joka tulisi ilmi mittauksissa: tästä huolimatta tulokset eivät ole vakuuttavia, tai jopa virheellisiä. Koe tulisi tarkastella ja toistaa asian varmistamiseksi.

Solukalvon yhteydessä esiintyvät hiilihappoanhydraasit (CA) kykenevät tehostamaan MCT-proteiinien toimintaa ei-katalyyttisesti (Klier ja muut 2011). Näistä CAIV esiintyy solukalvon ulkopuolella, jossa se voi liittyä sekä basigiiniin että embigiiniin. CAII puolestaan on solunsisäinen ja kykenee liittymään vain basigiiniin (Forero-Quintero ja muut 2019). Jos näitä anhydraaseja onnistuttaisiin lisäämään koesoluihin, tai toteamaan niiden luonnollinen ilmeneminen ja niiden aineenvaihduntaa tehostava vaikutus todeta,

näitä anhydraaseja voitaisiin käyttää vahvistamaan basigiini- sekä embigiiniriippuvaista aineenvaihduntaa. Teoriassa vain embigiinin yhteydessä toimivan CAII:n tulisi lisätä embigiinin tärkeyttä, jolloin sen hiljenemisellä olisi suurempi vaikutus soluihin. Basigiinin toimintaa lisäävä CAIV:n käyttöä helpottaa sen riippuvuus basigiinista. Sen toiminta voidaan estää häiritsemällä basigiinia (Wilson ja muut 2005), kuten kokeissa jo tehtiin. CAIV voidaan myös jättää pois ja käyttää vain embigiinin tehokkuutta lisäävää CAII:ta.

6 Yhteenveto

Tutkimuksissa selvitettiin basigiiniperheen ja MCT-proteiinien vuorovaikutuksia ja niiden muutoksien vaikutuksia toisiinsa. Tutkimuksia varten vaadittiin sopivat solut. Keratinosyyttisolujen todettiin ilmentävän basigiinia ja embigiiniä, sekä lukuisia MCT-proteiineja, etenkin oleellisimpia MCT1 ja 2-proteiineja, tehden nämä solut sopiviksi näiden proteiinien tutkimuksia varten. Käytetty Agilent Seahorse -laitteiston sopivuus koeasetelman tutkimukseen todettiin saamalla oleellista tietoa. Kyseistä menetelmää voidaan soveltaa lisätutkimuksiin.

Embigiinin hiljennyksellä voidaan havaita olevan kvantitatiivinen, tilastollisesti merkittävä vaikutus solujen aineenvaihduntaan. Basigiinin hiljennyksellä havaittiin myös vaikutus. Tutkimukset ovat linjassa aikaisempien tutkimusten (Jung ja muut 2016) kanssa viitaten siihen, että MCT-proteiinit ovat vahvasti riippuvaisia basigiiniperheen proteiineista, joiden estyminen häiritsee myös solujen aineenvaihduntaa merkittävästi.

Tutkimusta tulisi jatkaa erilaisilla kokeilla, hyödyntäen hiilihappoanhydraaseja, erilaisia hiljennyksiä sekä soluväliaineen proteiineja. Embigiinin, MCT-proteiinien ja niihin liittyvien proteiinien toimintaa ymmärretään jatkuvasti paremmin ja niiden tärkeiden roolien edelleen parempi ymmärtäminen täydentää ihmistenkin elämän ja terveyden ymmärtämistä, sekä lääketieteen kehitystä.

Lähteet

- Albelda, S. & Buck, C. (1990) Integrins and Other Cell-Adhesion Molecules. *Faseb J* **4**:2868-2880.
- Barczyk, M., Carracedo, S. & Gullberg, D. (2010) Integrins. *Cell Tissue Res* **339**:269-280.
- Beesley, P.W., Herrera-Molina, R., Smalla, K. & Seidenbecher, C. (2014) The Neuroligin adhesion molecules: key regulators of neuronal plasticity and synaptic function. *J Neurochem* **131**:268-283.
- Bevilacqua, M. & Nelson, R. (1993) Selectins. *J Clin Invest* **91**:379-387.
- Bröer, S., Bröer, A., Schneider, H.P., Stegen, C., Halestrap, A.P. & Deitmer, J.W. (1999) Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* **341** (Pt 3):529-535.
- Bröer, S., Schneider, H.P., Bröer, A., Rahman, B., Hamprecht, B. & Deitmer, J.W. (1998) Characterization of the monocarboxylate transporter 1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem J* **333** (Pt 1):167-174.
- Carpenter, L. & Halestrap, A.P. (1994) The kinetics, substrate and inhibitor specificity of the lactate transporter of Ehrlich-Lettre tumour cells studied with the intracellular pH indicator BCECF. *Biochem J* **304** (Pt 3):751-760.
- Carpenter, L., Poole, R.C. & Halestrap, A.P. (1996) Cloning and sequencing of the monocarboxylate transporter from mouse Ehrlich Lettré tumour cell confirms its identity as MCT1 and demonstrates that glycosylation is not required for MCT1 function. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* **1279**:157-163.
- Chao, F., Zhang, J., Zhang, Y., Liu, H., Yang, C., Wang, J., Guo, Y., Wen, X., Zhang, K., Huang, B., Liu, D. & Li, Y. (2015) Embigin, regulated by HOXC8, plays a suppressive role in breast tumorigenesis. *Oncotarget* **6**:23496-23509.
- Chothia, C. & Jones, E.Y. (1997) The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem* **66**:823-862.
- Corbet, C., Draoui, N., Polet, F., Pinto, A., Drozak, X., Riant, O. & Feron, O. (2014) The SIRT1/HIF2 α axis drives reductive glutamine metabolism under chronic acidosis and alters tumor response to therapy. *Cancer Res* **74**:5507-5519.
- Cuff, M.A. & Shirazi-Beechey, S.P. (2002) The Human Monocarboxylate Transporter, MCT1: Genomic Organization and Promoter Analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **292**:1048-1056.
- Deuticke, B. (1982) Monocarboxylate transport in erythrocytes. *J Membr Biol* **70**:89-103.

Dhup, S., Dadhich, R.K., Porporato, P.E. & Sonveaux, P. (2012) Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr Pharm Des* **18**:1319-1330.

Dimmer, K.S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J.W. & Bröer, S. (2000) The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* **350 Pt 1**:219-227.

Forero-Quintero, L.S., Ames, S., Schneider, H., Thyssen, A., Boone, C.D., Andring, J.T., McKenna, R., Casey, J.R., Deitmer, J.W. & Becker, H.M. (2019) Membrane-anchored carbonic anhydrase IV interacts with monocarboxylate transporters via their chaperones CD147 and GP70. *J Biol Chem* **294**:593-607.

Frantz, C., Stewart, K.M. & Weaver, V.M. (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* **123**:4195-4200.

Gawantka, V., Pollet, N., Delius, H., Vingron, M., Pfister, R., Nitsch, R., Blumenstock, C. & Niehrs, C. (1998) Gene expression screening in *Xenopus* identifies molecular pathways, predicts gene function and provides a global view of embryonic patterning. *Mech Dev* **77**:95-141.

Guenette, R.S., Sridhar, S., Herley, M., Mooibroek, M., Wong, P. & Tenniswood, M. (1997) Embigin, a developmentally expressed member of the immunoglobulin superfamily, is also expressed during regression of prostate and mammary gland. *Dev Genet* **21**:268-278.

Guindolet, D. & Gabison, E.E. (2020) Role of CD147 (EMMPRIN/Basigin) in Tissue Remodeling. *Anat Rec* **303**:1584-1589.

Halestrap, A.P. & Price, N.T. (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* **343**:281-299.

Halestrap, A. (2013) The SLC16 gene family – Structure, role and regulation in health and disease. *Molecular aspects of medicine* **34**:337-349.

Halestrap, A.P. (2012) The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. *IUBMB Life* **64**:1-9.

Halestrap, A.P. (2013) Monocarboxylic Acid Transport. *Compr Physiol* **3**:1611-1643.

Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W. & Zimmermann, P. (2008) Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. **2020**.

Huang, R., Ozawa, M., Kadomatsu, K. & Muramatsu, T. (1993) Embigin, a Member of the Immunoglobulin Superfamily Expressed in Embryonic Cells, Enhances Cell-Substratum Adhesion. *Developmental Biology* **155**:307-314.

- Huang, R., Ozawa, M., Kadomatsu, K. & Muramatsu, T. (1990) Developmentally regulated expression of embigin, a member of the immunoglobulin superfamily found in embryonal carcinoma cells. *Differentiation* **45**:76-83.
- Jackson, V.N., Price, N.T. & Halestrap, A.P. (1995) cDNA cloning of MCT1, a monocarboxylate transporter from rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **1238**:193-196.
- Jarvelainen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N. & Penttinen, R. (2009) Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* **61**:198-223.
- Jung, D.E., Kim, J.M., Kim, C. & Song, S.Y. (2016) Embigin is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates cell motility through epithelial to mesenchymal transition via the TGF- pathway. *Mol Carcinog* **55**:633-645.
- Kansas, G.S. (1996) Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood* **88**:3259-3287.
- Kirk, P., Wilson, M.c., Heddle, C., Brown, M.h., Barclay, A.n. & Halestrap, A.p. (2000) CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *The EMBO Journal* **19**:3896-3904.
- Klier, M., Schueler, C., Halestrap, A.P., Sly, W.S., Deitmer, J.W. & Becker, H.M. (2011) Transport Activity of the High-affinity Monocarboxylate Transporter MCT2 Is Enhanced by Extracellular Carbonic Anhydrase IV but Not by Intracellular Carbonic Anhydrase II. *J Biol Chem* **286**:27781-27791.
- Li, K. & Nowak, R.A. (2020) The role of basigin in reproduction. *Reproduction* **159**:R97-R109.
- Liao, C., Kong, L., Song, F., Xing, J., Wang, L., Sun, Z., Tang, H., Yao, H., Zhang, Y., Wang, L., Wang, Y., Yang, X., Li, Y. & Chen, Z. (2011) Characterization of basigin isoforms and the inhibitory function of basigin-3 in human hepatocellular carcinoma proliferation and invasion. *Mol Cell Biol* **31**:2591-2604.
- Mannowetz, N., Wandernoth, P. & Wennemuth, G. (2012) Basigin interacts with both MCT1 and MCT2 in murine spermatozoa. *J Cell Physiol* **227**:2154-2162.
- Marieangela C. Wilson, Vicky N. Jackson, Catherine Heddle, Nigel T. Price, Henriette Pilegaard, Carsten Juel, Arend Bonen, Ian Montgomery, Otto F. Hutter & Andrew P. Halestrap (1998) Lactic Acid Efflux from White Skeletal Muscle Is Catalyzed by the Monocarboxylate Transporter Isoform MCT3. *The Journal of biological chemistry* **273**:15920-15926.
- Miyauchi, T., Masuzawa, Y. & Muramatsu, T. (1991) The Basigin Group of the Immunoglobulin Superfamily: Complete Conservation of a Segment in and around Transmembrane Domains of Human and Mouse Basigin and Chicken HT7 Antigen. *The Journal of Biochemistry* **110**:770-774.

- Muramatsu, T. (2016) Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *J Biochem* **159**:481-490.
- Ozawa, M., Huang, R.P., Furukawa, T. & Muramatsu, T. (1988) A teratocarcinoma glycoprotein carrying a developmentally regulated carbohydrate marker is a member of the immunoglobulin gene superfamily. *J Biol Chem* **263**:3059-3062.
- Perez-Escuredo, J., Van Hee, V.F., Sboarina, M., Falces, J., Payen, V.L., Pellerin, L. & Sonveaux, P. (2016) Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Res* **1863**:2481-2497.
- Pertega-Gomes, N., Vizcaino, J.R., Felisbino, S., Warren, A.Y., Shaw, G., Kay, J., Whitaker, H., Lynch, A.G., Fryer, L., Neal, D.E. & Massie, C.E. (2015) Epigenetic and oncogenic regulation of SLC16A7 (MCT2) results in protein over-expression, impacting on signalling and cellular phenotypes in prostate cancer. *Oncotarget* **6**:21675-21684.
- Pierre, K. & Pellerin, L. (2005) Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* **94**:1-14.
- Pridans, C., Holmes, M.L., Polli, M., Wettenhall, J.M., Dakic, A., Corcoran, L.M., Smyth, G.K. & Nutt, S.L. (2008) Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation. *J Immunol* **180**:1719-1728.
- Robert C. Poole & Andrew P. Halestrap (1997) Interaction of the Erythrocyte Lactate Transporter (Monocarboxylate Transporter 1) with an Integral 70-kDa Membrane Glycoprotein of the Immunoglobulin Superfamily. *The Journal of biological chemistry* **272**:14624-14628.
- Robert J. Belton, J., Li Chen, Fernando S. Mesquita & Romana A. Nowak (2008) Basigin-2 Is a Cell Surface Receptor for Soluble Basigin Ligand. *The Journal of biological chemistry* **283**:17805-17814.
- Ruma, I.M.W., Kinoshita, R., Tomonobu, N., Inoue, Y., Kondo, E., Yamauchi, A., Sato, H., Sumardika, I.W., Chen, Y., Yamamoto, K., Murata, H., Toyooka, S., Nishibori, M. & Sakaguchi, M. (2018) Embigin Promotes Prostate Cancer Progression by S100A4-Dependent and-Independent Mechanisms. *Cancers* **10**:239.
- Silberstein, L., Goncalves, K.A., Kharchenko, P.V., Turcotte, R., Kfoury, Y., Mercier, F., Baryawno, N., Severe, N., Bachand, J., Spencer, J.A., Papazian, A., Lee, D., Chitteti, B.R., Srour, E.F., Hoggatt, J., Tate, T., Lo Celso, C., Ono, N., Nutt, S., Heino, J., Sipila, K., Shioda, T., Osawa, M., Lin, C.P., Hu, G. & Scadden, D.T. (2016) Proximity-Based Differential Single-Cell Analysis of the Niche to Identify Stem/Progenitor Cell Regulators. *Cell Stem Cell* **19**:530-543.
- Tachikui, H., Kurosawa, N., Kadomatsu, K. & Muramatsu, T. (1999) Genomic organization and promoter activity of embigin, a member of the immunoglobulin superfamily. *Gene* **240**:325-332.

Thul, P.J., Åkesson, L., Wiking, M., Mahdessian, D., Geladaki, A., Ait Blal, H., Alm, T., Asplund, A., Björk, L., Breckels, L.M., Bäckström, A., Danielsson, F., Fagerberg, L., Fall, J., Gatto, L., Gnann, C., Hober, S., Hjelmare, M., Johansson, F., Lee, S., Lindskog, C., Mulder, J., Mulvey, C.M., Nilsson, P., Oksvold, P., Rockberg, J., Schutten, R., Schwenk, J.M., Sivertsson, Å, Sjöstedt, E., Skogs, M., Stadler, C., Sullivan, D.P., Tegel, H., Winsnes, C., Zhang, C., Zwahlen, M., Mardinoglu, A., Pontén, F., von Feilitzen, K., Lilley, K.S., Uhlén, M. & Lundberg, E. (2017) A subcellular map of the human proteome. *Science* **356**.

Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å, Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C.A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J. & Pontén, F. (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**:1260419.

Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhor, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., Sanli, K., von Feilitzen, K., Oksvold, P., Lundberg, E., Hober, S., Nilsson, P., Mattsson, J., Schwenk, J.M., Brunnström, H., Glimelius, B., Sjöblom, T., Edqvist, P., Djureinovic, D., Micke, P., Lindskog, C., Mardinoglu, A. & Ponten, F. (2017) A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* **357**.

Vyacheslav Yurchenko, Gabriele Zybarth, Matthew O'Connor, Wei Wei Dai, Giovanni Franchin, Tang Hao, Huiming Guo, Hsiu-Cheng Hung, Bryan Toole, Philippe Gallay, Barbara Sherry & Michael Bukrinsky (2002) Active Site Residues of Cyclophilin A Are Crucial for Its Signaling Activity via CD147. *The Journal of biological chemistry* **277**:22959-22965.

Wilson, M.C., Meredith, D., Fox, J.E.M., Manoharan, C., Davies, A.J. & Halestrap, A.P. (2005) Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4 - The ancillary protein for the insensitive MCT2 is embigin (gp70). *J Biol Chem* **280**:27213-27221.